

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO  
EM COMPORTAMENTOS  
SOCIALMENTE MOTIVADOS**

ANA CLÁUDIA SCHNEIDER RASLAN

BELO HORIZONTE

2011

ANA CLÁUDIA SCHNEIDER RASLAN

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO  
EM COMPORTAMENTOS  
SOCIALMENTE MOTIVADOS**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-  
Graduação em Fisiologia e Farmacologia do  
Departamento de Fisiologia e Biofísica do  
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Minas Gerais como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra Grace Schenatto Pereira

BELO HORIZONTE

2011

## **AGRADECIMENTOS**

À prof<sup>a</sup> Grace, pela oportunidade de aprendizado, por ter sido uma orientadora sempre presente e acessível e, acima de tudo, pela confiança que depositou em mim.

Aos meus pais, Kassim e Elizabeth, meu porto-seguro, pelo amor incondicional, pelo investimento na minha educação e por me apoiarem nas minhas escolhas.

Aos meus irmãos, Kacá, Bruno e Dani, pessoas essenciais na minha vida, pelo carinho e exemplo.

Aos meus sobrinhos, Larissa e Felipe, pela alegria que trazem à minha vida.

À amiga Brisa, tão importante nesta jornada, pela cumplicidade, contribuição com idéias, ajuda nos experimentos e, principalmente, pela força nos momentos mais difíceis.

Ao Rafael, que tanto me incentivou.

A Cristina, Isabela, Guilherme, Cristiane e Marina, pelos bons momentos e por se mostrarem sempre disponíveis em ajudarem.

Aos amigos Hércules, Dani Bernardes e Luciana, pela colaboração, conselhos e companheirismo.

Ao Gustavo Rezende, Marcelo, Daniel e Flávio, pelos momentos de descontração na hora do café, e a todos os colegas do NNC, por terem tornado o dia-a-dia mais leve.

Aos professores Márcio, Juliana e André, pelas sugestões e críticas.

Aos colegas do Departamento, pela contribuição e ótimo convívio.

Aos meus amigos da graduação, por terem torcido por mim.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	1
Palavras-chave.....	2
Abstract.....	2
Lista de Abreviaturas.....	3
Lista de figuras.....	4
1. INTRODUÇÃO .....	5
1.1. Comportamento Social.....	5
1.1.1. Processamento da Informação Social .....	5
1.1.2. Memória Social .....	7
1.1.3. Comportamento Agressivo .....	9
1.2. Sistema Colinérgico .....	11
1.2.1. Neurotransmissão Colinérgica .....	11
1.2.2. Sistema Colinérgico no Sistema Nervoso Central .....	12
1.2.3. Sistema Colinérgico e Cognição.....	14
1.3 Vasopressina .....	15
1.3.1. Vasopressina e Comportamento Social.....	17
1.3.2. Sistema Colinérgico e Vasopressina .....	17
1.4. Animais <i>Knockdown</i> para o Transportador Vesicular de Acetilcolina .....	18
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo Geral .....	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3. JUSTIFICATIVA .....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
4.1. Animais .....	22
4.2. Teste de atividade exploratória em animais VACHT KD <sup>HOM</sup> .....	22
4.3. Tarefa de Reconhecimento Social .....	23
4.3.1. Drogas .....	23
4.4. Teste de agressividade .....	24
4.4.1 Drogas .....	24

4.5.	Labirinto em Cruz Elevado.....	24
4.7.	Imunohistoquímica.....	25
4.7.1.	Análise das imagens.....	26
4.8.	Delineamento Experimental.....	27
4.9.	Análise Estatística.....	32
5.	RESULTADOS.....	33
5.1.	Atividade locomotora em animais VACHT KD <sup>HOM</sup> .....	33
5.2.	Memória social de curta duração em animais VACHT KD.....	34
5.3.	Memória social de longa duração em animais VACHT KD.....	35
5.4.	Memória social de longa duração em animais VACHT WT expostos à administração i.p. de atropina.....	35
5.5.	Memória social de longa duração em animais VACHT KD após administração de fisostigmina.....	36
5.6.	Comportamento social agressivo em animais VACHT KD.....	38
5.7.	Comportamento relacionado à ansiedade em animais VACHT KD.....	40
5.8.	Habilidade olfativa de animais VACHT KD.....	41
5.9.	Neurônios vasopressinérgicos em animais VACHT KD.....	42
5.10.	Comportamento social agressivo em animais VACHT KD <sup>HET</sup> após administração de vasopressina.....	44
6.	DISCUSSÃO.....	45
7.	CONCLUSÕES.....	52
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

## RESUMO

A acetilcolina (ACh) é um importante modulador de processos cognitivos, como aprendizado, memória e atenção. Pouco se sabe, entretanto das conseqüências da redução da neurotransmissão colinérgica sobre comportamentos socialmente motivados.

Neste trabalho, avaliamos a participação do sistema colinérgico na memória social e no comportamento agressivo, através da administração de atropina, um antagonista de receptores colinérgicos do tipo muscarínicos e de animais geneticamente modificados, com menor expressão do gene para o transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), os camundongos VACHT *knockdown* (VACHT KD). Estes animais são um modelo de hipofunção colinérgica ocasionada por uma diminuição da expressão do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Nossos resultados demonstraram um prejuízo na memória social de longa duração (MSLD) nos animais VACHT KD<sup>HET</sup> cuja expressão de VACHT é em torno de 50%. Já os animais VACHT KD<sup>HOM</sup>, que expressam cerca de 30% da VACHT, demonstraram prejuízo na memória social de curta (MSCD) e de longa duração. Os déficits de memória dos grupos VACHT KD não podem ser relacionados a alterações no comportamento tipo ansiedade nem na capacidade olfativa para detecção de odores, que foram avaliados no teste de labirinto em cruz elevado e o teste de habilidade olfativa. Demonstramos, ainda, que a atropina, administrada imediatamente após a aquisição da memória, prejudicou sua retenção, sugerindo que a sinalização colinérgica via receptores muscarínicos é necessária para a consolidação da memória social de longa-duração. Entretanto, a administração de fisostigmina, um inibidor de acetilcolinesterase, imediatamente após o treino da tarefa de reconhecimento social, não foi capaz de reverter o comprometimento da MSLD de animais VACHT KD. Em conjunto, nossos resultados demonstram que a diminuição do tônus colinérgico central compromete a aquisição e o armazenamento da memória social de longa duração. Avaliamos também a participação do sistema colinérgico na agressividade. O comportamento agressivo ofensivo apresenta-se exacerbado em animais VACHT KD<sup>HET</sup> e VACHT KD<sup>HOM</sup>, com prevalência seis e três vezes maior, respectivamente, de indivíduos agressivos na amostragem estudada, em relação ao grupo VACHT WT. Foi observada também diferença significativa quanto ao número de ataques contra um indivíduo intruso, sendo maior no grupo VACHT KD<sup>HET</sup> em relação ao grupo VACHT WT. Estudos sugerem que a acetilcolina pode alterar a síntese de vasopressina, um neuropeptídeo que modula comportamentos socialmente motivados. Portanto, decidimos avaliar a participação da vasopressina na exacerbação do comportamento agressivo dos animais VACHT KD. Não houve diferença significativa quanto à imunoreatividade para vasopressina no núcleo paraventricular (PVN) entre os grupos

VAC<sub>h</sub>T WT e VAC<sub>h</sub>T KD. Entretanto, observamos que a administração de vasopressina foi capaz de impedir a expressão do comportamento agressivo em animais VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup>. A vasopressina diminuiu também o tempo de investigação olfatória social dos animais VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup> sobre o intruso, durante o teste de agressividade. Em conjunto, nossos resultados demonstram que a acetilcolina exerce papel fundamental sobre o processamento da informação social, além de sugerir uma relação entre os sistemas colinérgico e vasopressinérgico centrais sobre o comportamento agressivo, já que um comprometimento da neurotransmissão colinérgica exacerba a expressão do comportamento agressivo, o qual é revertido pela administração de vasopressina.

### **Palavras-chave**

Acetilcolina, comportamento social, memória social, comportamento agressivo, tarefa de reconhecimento social, vasopressina.

### **Abstract**

Acetylcholine (ACh) modulates cognition, such learning, as memory and attention. However, little is known about the effects of reduced cholinergic tonus on socially motivated behaviour.

Here, we evaluated the cholinergic system role in social memory and aggressive behaviour, through the administration of atropine, a muscarinic acetylcholine receptor antagonist, and by using genetically modified animals, the VAC<sub>h</sub>T knockdown mice. These animals have expression of acetylcholine vesicular transporter (VAC<sub>h</sub>T) reduced, then representing a model of cholinergic hypofunction. Our results demonstrated long-term social memory (LTSM) impairment in VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup> mice whose VAC<sub>h</sub>T expression is around 50%. VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HOM</sup>, which expresses around 30% of VAC<sub>h</sub>T protein, show short-term and long-term social memory deficits. The memory impairments of VAC<sub>h</sub>T KD groups are not related to anxiety or reduced olfactory abilities, which were evaluated in the elevated plus-maze and buried food-finding test. We also demonstrated that the administration of atropine immediately after memory acquisition impaired its retention, thus suggesting that cholinergic signalling through muscarinic receptors is necessary to consolidation of LTSM. However, the acetylcholinesterase inhibitor fisostigmine, administered immediately after training, was not able to reverse LTSM impairment of VAC<sub>h</sub>T KD mice. Our results indicate that reduced

cholinergic tonus impairs the acquisition and the retention of LTSM. We also evaluated the effect of reduced cholinergic tonus on aggressive behaviour. VAcHT KD<sup>HET</sup> and VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice are six and three times, respectively, more aggressive than VAcHT WT mice. Furthermore, the number of attacks was higher in VAcHT KD<sup>HET</sup> mice compared to VAcHT WT mice. There are studies suggesting that acetylcholine may modulate vasopressin synthesis, and vasopressin seems to modulate socially motivated behaviours. Thus, we decided to evaluate the vasopressin participation on the aggressive behaviour of VAcHT KD mice. There was no difference between VAcHT WT and VAcHT KD mice regarding vasopressin immunoreactivity in the paraventricular nucleus. However, vasopressin administration was able to blockade the aggressive behaviour expression in VAcHT KD<sup>HET</sup> mice. In addition, vasopressin also reduced the duration that VAcHT KD<sup>HET</sup> mice spent investigating the intruder during the aggressive test. Taken together our results demonstrate that cholinergic tonus has an essential role on social information processing and also suggest a cross-talk between cholinergic and vasopressinergic systems in modulating aggressive behaviour, since decrease of cholinergic tonus produces an exacerbated aggressive behaviour, which is blockade by vasopressin administration.

#### Key-words

Acetylcholine, social behaviour, social memory, aggressive behaviour, social recognition task, vasopressin.

#### Lista de Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Ch	Colina
ChAT	Colina acetiltransferase
CHT1	Transportador de colina de alta afinidade
CREB	Proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc
MCD	Memória de curta duração
MLD	Memória de longa duração
mAChRs	Receptores muscarínicos de ACh
nAChRs	Receptores nicotínicos de ACh
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc



PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
SON	Núcleo supraóptico do hipotálamo
VAC <sub>h</sub> T	Transportador vesicular de Acetilcolina
VAC <sub>h</sub> T KD <sup>HET</sup>	Camundongo “knock-down” heterozigoto para o VAC <sub>h</sub> T
VAC <sub>h</sub> T KD <sup>HOM</sup>	Camundongo “knock-down” homozigoto para o VAC <sub>h</sub> T
VP	Vasopressina

## Lista de figuras

- Figura 1.1: Divisão anatômica e funcional dos dois sistemas olfatórios de roedores.
- Figura 1.2: Fases da consolidação das memórias.
- Figura 1.3: Neuroanatomia do comportamento agressivo.
- Figura 1.4: Representação da neurotransmissão colinérgica.
- Figura 1.5: Distribuição de neurônios colinérgicos e suas projeções no cérebro de roedores.
- Figura 1.6: Representação das projeções da vasopressina no cérebro e na periferia.
- Figura 1.7: Desenho esquemático do gene colinérgico.
- Figura 3.1: Os desafios da Neurociência Social.
- Figura 4.2: Coordenadas estereotáxicas do cérebro de camundongo para o PVN.
- Figura 5.1: Atividade locomotora espontânea em animais VAC<sub>h</sub>T WT e VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HOM</sup>.
- Figura 5.2: Memória social de curta duração em animais VAC<sub>h</sub>T WT e VAC<sub>h</sub>T KD.
- Figura 5.3: Memória social de longa duração em animais VAC<sub>h</sub>T WT e VAC<sub>h</sub>T KD.
- Figura 5.4: Efeito da atropina na consolidação da MLD social de animais VAC<sub>h</sub>T WT.
- Figura 5.5: Efeito da fisostigmina 0,3 mg/kg na consolidação MLD social de animais VAC<sub>h</sub>T KD.
- Figura 5.6: Perfil comportamental de animais VAC<sub>h</sub>T WT e VAC<sub>h</sub>T KD no teste de agressividade.
- Figura 5.7: Perfil comportamental relacionado à ansiedade de animais VAC<sub>h</sub>T WT e VAC<sub>h</sub>T KD.
- Figura 5.8: Função olfatória em animais VAC<sub>h</sub>T WT e VAC<sub>h</sub>T KD.
- Figura 5.9: Neurônios vasopressinérgicos em animais VAC<sub>h</sub>T WT e VAC<sub>h</sub>T KD.
- Figura 5.10: Efeito da vasopressina no comportamento de investigação olfatória social de animais VAC<sub>h</sub>T WT e VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup> no teste de comportamento agressivo.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Comportamento Social

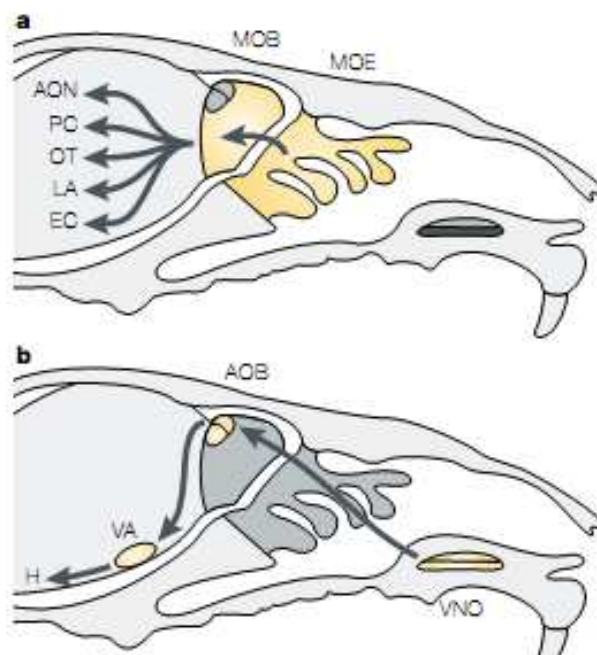
Comportamento pode ser definido como o conjunto de respostas de um organismo em uma dada situação ou ainda como a resposta específica a um ou mais estímulos específicos (dicionário Thesaurus). Neste contexto, o comportamento socialmente motivado compreende as respostas fisiológicas de um indivíduo frente à interação com um ou mais membros da mesma espécie. O acasalamento, o cuidado parental, a agressividade, a afiliação e a memória social são tipos de interações sociais, sendo que, algumas delas podem ser observadas não só em organismos complexos, como os mamíferos, mas também em organismos mais simples, como insetos e nematódeos, estando, portanto, conservadas ao longo da evolução (Sokolowski, 2010).

### 1.1.1. Processamento da Informação Social

No ser humano, foi observado que a percepção visual de faces evoca a atividade do giro fusiforme lateral em maior intensidade do que a percepção de um estímulo não social (Haxby *et al.*, 2002). Já em roedores, o sistema olfatório acessório detecta exclusivamente pistas olfatórias de caráter social. Logo, essas evidências sugerem que o cérebro possui circuitos neurais específicos para o processamento de estímulos sociais.

A transdução do estímulo social pode ocorrer através de diversas vias sensoriais em diferentes grupos de animais. Na maioria dos mamíferos, dentre eles os roedores, os estímulos sociais são percebidos através de pistas olfatórias, os feromônios. Os feromônios são definidos como o conjunto de odores não voláteis emanados e detectados por indivíduos da mesma espécie, permitindo a identificação do status social, sexo e idade de um indivíduo. As experiências sociais podem induzir tanto efeitos imediatos, como a expressão de comportamento agressivo ou sexual, quanto mudanças mais duradouras, como alterações hormonais e fisiológicas, no animal receptor (Dulac e Torello, 2003). Por exemplo, animais adultos expostos a modificações no ambiente social durante a infância apresentam alterações no número de células vasopressinérgicas no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Tanaka *et al.*, 2010; Todeschin *et al.*, 2009).

Roedores possuem dois sistemas olfatórios: o principal e o acessório (fig 1.1). O sistema olfatório principal detecta, além dos feromônios, uma extensa gama de odores voláteis de caráter não social, como os provenientes de alimentos, predadores e presas. Estes odores são captados por receptores olfatórios presentes no epitélio olfatório. A informação, então, é transmitida, via trato olfatório lateral, para o bulbo olfatório principal e é então processada em uma via complexa que envolve áreas corticais e sistema límbico, dentre elas, hipocampo e córtex entorrinal (Sanchez-Andrade *et al.*, 2005). Já o sistema olfatório acessório detecta exclusivamente os feromônios, que são captados pelo órgão vomeronasal após contato físico direto com um co-específico. O órgão vomeronasal, situado na cavidade nasal, projeta para o bulbo olfatório acessório, que envia as informações para a amígdala e hipotálamo, regiões envolvidas no processamento de emoções e controle neuroendócrino (Dulac e Torello, 2003).



**Figura 1.1: Divisão anatômica e funcional dos dois sistemas olfatórios em mamíferos.** Sistema olfatório principal (a): epitélio olfatório principal (MOE), bulbo olfatório principal (MOB), núcleo olfatório anterior (AON), córtex piriforme (PC), tubérculo olfatório (OT), região lateral da amígdala cortical (LA), córtex entorrinal (EC). Sistema olfatório acessório (b): órgão vomeronasal (VNO); bulbo olfatório acessório (AOB); amígdala vomeronasal (VA) que inclui núcleo intersticial da estria terminal, amígdala medial e região posterior da amígdala cortical; hipotálamo (H). (Dulac e Torello, 2003).

A inervação colinérgica para o bulbo olfatório tem papel essencial na modulação das alterações plásticas que ocorrem nesta estrutura durante o processamento de odores. O

bulbo olfatório principal possui três camadas celulares, formadas por células mitrais/tufosas, células periglomerulares e células granulares. As células mitrais/tufosas recebem as sinapses dos terminais do nervo olfatório e projetam para sinapses que levam à saída da informação do bulbo olfatório. A atividade das células mitrais é controlada pela inibição GABAérgica advinda das células granulares. Durante o processamento de odores, o aumento na atenção e vigília acarretam na liberação de acetilcolina e noradrenalina no bulbo olfatório, que reduzem o *feedback* GABAérgico advindo das células granulares, levando assim, à desinibição das células mitrais. Estas células ficam então responsivas à percepção de odores, possibilitando assim o *output* da informação olfativa para o sistema límbico e áreas corticais, o que acarreta, por fim, na expressão do comportamento do animal em resposta ao estímulo olfatório (Sanchez-Andrade *et al.*, 2005).

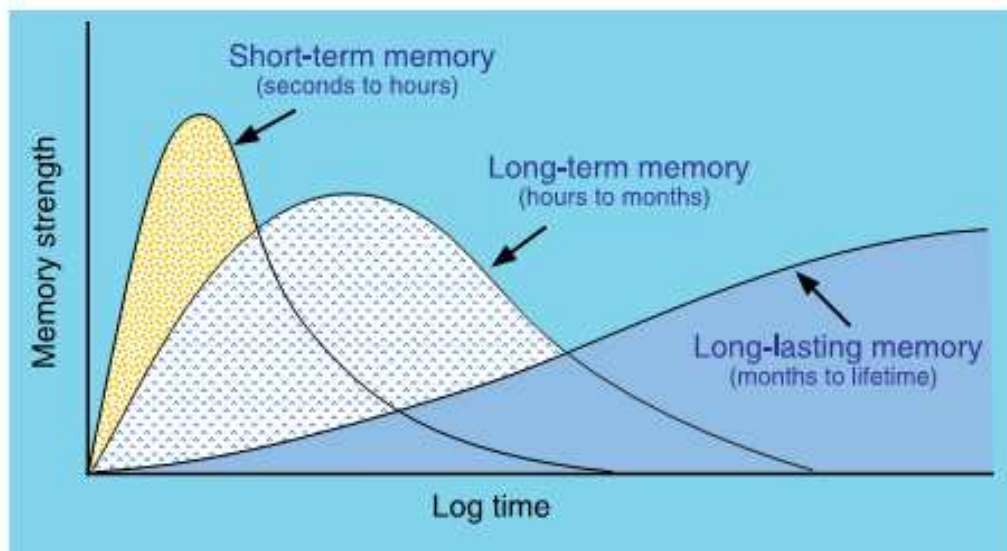
### 1.1.2. Memória Social

Memória é o processo de armazenamento e evocação de informações adquiridas através de experiências, tendo início com a aquisição de informações sensoriais provenientes do meio (Izquierdo, 2002).

A memória do tipo social é aquela que permite o reconhecimento de um co-específico. O reconhecimento social precede o estabelecimento de interações sociais, gerando conseqüências funcionais em diversos contextos sociais. O reconhecimento de filhotes, por exemplo, permite à mãe dedicar cuidados maternos apenas à sua cria. Um animal macho adulto, por sua vez, inicia um comportamento social apropriado, que pode ser agressão ou afiliação, diante da identificação de outro macho, ou acasalamento, após reconhecimento de uma fêmea. Dessa forma, o reconhecimento social é crucial para a manutenção da estrutura social de uma população (Sanchez-Andrade *et al.*, 2005).

As memórias podem ser classificadas quanto à sua duração, em memória de trabalho, memória de curta (MCD) e de longa duração (MLD) (Izquierdo, 2002). A memória de curta duração é consolidada de segundos a minutos depois da aquisição da informação e é retida por algumas horas. A memória de longa duração, por sua vez, tem consolidação mais lenta e é armazenada por horas, dias ou até mesmo a vida inteira, sendo denominada, neste último caso, como memória remota (Fig 1.2). Foi demonstrado que a consolidação da MCD e da MLD, quando avaliadas na tarefa de esQUIVA inibitória, possui algumas vias moleculares em comum. Entretanto, a MCD parece não ser um passo inicial da MLD, pois diferentes tratamentos podem bloquear a consolidação de uma, mantendo a outra intacta (Izquierdo *et al.*, 2002). A MLD, exclusivamente, depende de dois picos de expressão gênica

e síntese de proteína *de novo*, acompanhados por um aumento na atividade da enzima PKA e nos níveis de CREB. CREB é um fator de transcrição que, após ser fosforilado pela PKA, ativa a transcrição de vários genes que parecem participar da formação da memória de longa duração através da modulação da excitabilidade neuronal e plasticidade sináptica (Benito e Barco, 2010).



**Figura 1.2: Fases da consolidação da memória.** A consolidação da memória de longa duração é mais lenta e ocorre paralelamente à consolidação da memória de curta duração, envolvendo processos independentes. (McGaugh, 2000).

Em roedores, a memória social é estudada pela tarefa de reconhecimento social, na qual se observa que um animal dedica menos tempo explorando um co-específico após sucessivas apresentações do mesmo (Insel e Fernand, 2004). Neste paradigma, animais socialmente isolados têm sido utilizados para estudo da memória de curta duração, já que foi encontrado que a memória social de roedores não é retida por mais de 1 hora. Entretanto, foi observado que em animais mantidos em grupos sociais, a memória social perdura por até 7 dias (Kogan *et al.*, 2000). Essa memória de longa duração é CREB dependente e necessita de síntese protéica, que parece ocorrer em pelo menos dois estágios (Kogan *et al.*, 2000; Richter *et al.*, 2005).

As memórias podem ser classificadas também de acordo com seu conteúdo, em memórias declarativas e não-declarativas (Izquierdo *et al.*, 2002). A memória declarativa ou

explícita registra fatos e eventos pessoais, além de conhecimentos adquiridos, e pode ser declarada de forma consciente pelo indivíduo. A memória não-declarativa ou implícita, por sua vez, envolve habilidades motoras e sensoriais, além de aspectos emocionais, e não exige um controle consciente ou reflexão (Squire e Kandel, 2003). A memória social não está incluída na classificação acima citada, porém compartilha com outros tipos de memória declarativa, o processamento primordial em estruturas do lobo temporal, como os córtices entorrinal e perirrinal (Petruilis e Einchenbaum, 2003), o hipocampo (Staubli *et al.*, 1984; Kogan *et al.*, 2000), córtices piriforme e frontal (Keller *et al.*, 2005).

Alguns dados da literatura sugerem que o reconhecimento social é um importante mecanismo modulatório para a ocorrência de comportamentos agressivos., sendo que estes são motivados especialmente por odores de co-específicos não familiares. Porém, o mecanismo neural da relação entre reconhecimento social e agressividade ainda não foi elucidado (Adams, 2006).

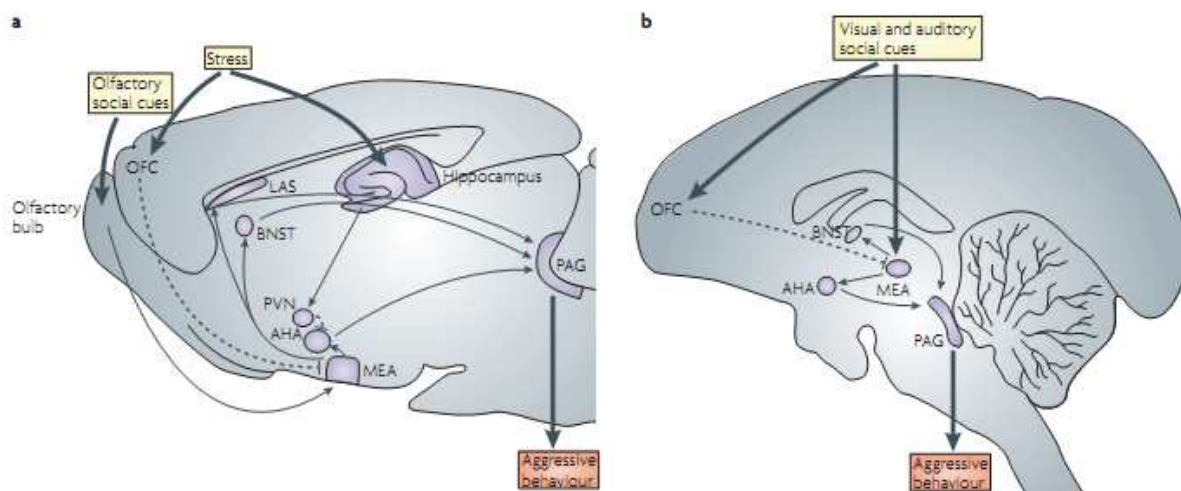
### **1.1.3. Comportamento Agressivo**

O comportamento agonístico é uma interação social motivada pela competição por território, parceiro sexual e alimentos. Existem três tipos de comportamentos agonísticos em camundongos: ofensa, defesa e marcação de território. A marcação de território é executada por um camundongo macho, que deixa odorantes de dominância contidos em sua urina, enquanto investiga o território. A ofensa e a defesa, por sua vez são comportamentos agonísticos considerados como formas de agressão física entre dois animais (Adams, 2006).

O comportamento agressivo pode ocorrer, por exemplo, quando um macho defende seu território da invasão de um intruso ou compete por recursos, e quando uma fêmea protege seus filhotes (Miczek *et al.*, 2001). Durante um encontro agonístico entre camundongos, é possível caracterizar comportamentos agressivos ofensivos e respostas agressivas defensivas. O animal ofensivo direciona mordidas principalmente contra o dorso do oponente; apresenta ataques laterais, em que o animal inclina seu corpo e efetua pequenos passos em direção ao oponente; e vibração de cauda, que geralmente precede um ataque. Esses comportamentos são intercalados por períodos de investigação social olfatória da região anogenital do oponente, além de inatividade social, como caminhada, *grooming* e *rearing*. O animal defensivo, por sua vez, apresenta as seguintes reações: fuga; postura defensiva, com elevação do corpo sobre as patas posteriores; vocalizações, e por fim, mordidas (Miczek *et al.*, 2001).

O circuito neural que medeia os comportamentos agressivos, de modo geral, é composto pela amígdala medial, septo lateral, núcleo intersticial da estria terminal, e hipotálamo anterior, com ativação final da substância cinzenta periaquedutal, cuja atividade desencadeia a expressão do comportamento agressivo. O córtex pré-frontal, por sua vez, tem efeito inibitório sobre o comportamento agressivo (fig 1.2) (Nelson e Trainor, 2007).

Durante a exibição de um comportamento ofensivo, é observada elevada atividade do hipotálamo anterior (Kruk *et al*, 1998; Halasz *et al.*, 2002), enquanto o comportamento defensivo é motivado principalmente pela atividade de regiões envolvidas com respostas ao medo e stress, como amígdala central e núcleo paraventricular do hipotálamo, além da substância cinzenta periaquedutal (Kollack-Walker *et al.*, 1997; Martinez *et al.*, 1998).



**Figura 1.3: Vias neuroanatômicas da agressão em roedores (a) e primatas não-humanos (b).** A informação social advinda de pistas olfatórias em roedores, ou percebida por vias visuais e auditivas, em primatas, é processada na amígdala medial (MeA) e enviada para septo lateral (LAS), núcleo basal da estria terminal (BNST), e área hipotalâmica anterior (AHA), com ativação final da substância cinzenta periaquedutal (PAG), desencadeando na expressão do comportamento agressivo. O córtex frontal orbital (OFC), por sua vez, possui atividade inibitória sobre o comportamento agressivo. (Nelson e Trainor, 2007).

Apesar de o comportamento agressivo levar a vantagens competitivas, ele pode ser considerado patológico quando é exibido de maneira exagerada, persistente ou fora de contexto. Alguns estudos sugerem que o comportamento agressivo exacerbado está relacionado especialmente a alterações na neurotransmissão serotoninérgica, GABAérgica,

dopaminérgica e noradrenérgica (Nelson e Trainor, 2007), faltando evidências para a participação do sistema colinérgico sobre a modulação do comportamento agressivo.

## **1.2. Sistema Colinérgico**

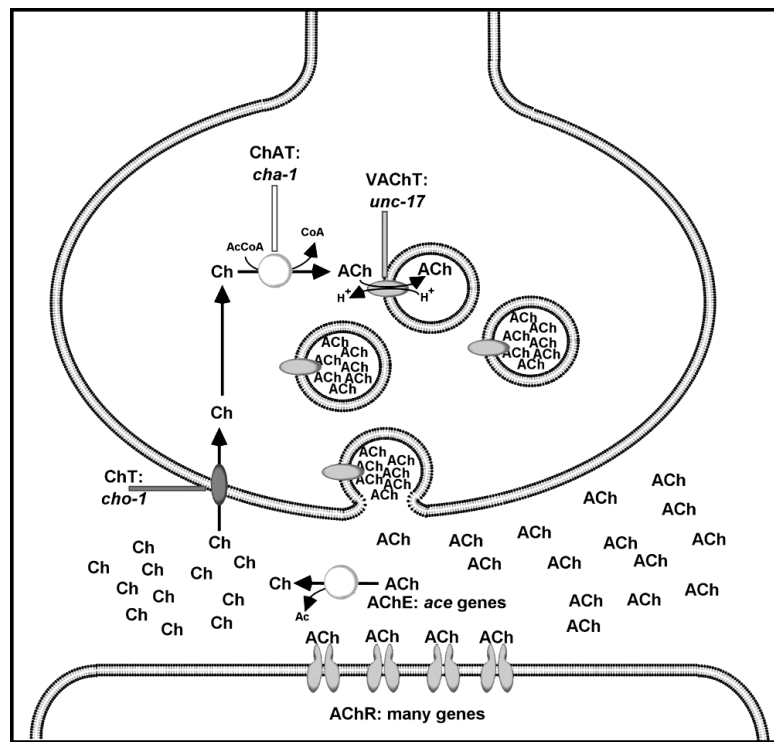
O sistema colinérgico tem participação fundamental em diversos processos fisiológicos. No sistema nervoso autônomo, controla a frequência cardíaca (Mendelowitz, 1999) e a contração da musculatura lisa gástrica (Rogers et al., 1999). Na junção neuromuscular, a ACh é liberada pelo neurônio motor e atua sobre a fibra muscular, possibilitando a sua contração (Ruff, 2003). No SNC, o sistema colinérgico está envolvido em funções cognitivas, como atenção e memória (Gold, 2003).

### **1.2.1. Neurotransmissão Colinérgica**

A neurotransmissão química foi demonstrada pela primeira vez por Otto Loewi, em 1921. Ao transferir a solução que banhava um coração de rã cujo nervo vago havia sido estimulado, para um coração cujo nervo vago havia sido extraído, Loewi observou que a frequência cardíaca do coração receptor diminuiu, e propôs então que a solução possuía uma substância química liberada pelo nervo vago, a “substância do vago”. Posteriormente, Loewi realizou a análise química da substância, que passou a ser denominada acetilcolina (ACh).

A síntese de ACh se dá a partir da transferência de um grupo acetil de uma molécula de acetil coenzima A (acetil CoA), proveniente da metabolização celular da glicose, para uma molécula de colina. Esta reação é catalisada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT), presente principalmente no citoplasma da célula colinérgica (fig 1.2). A ACh recém sintetizada é então armazenada em vesículas, através da atividade do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), que utiliza o gradiente eletroquímico da bomba  $H^+$ -ATPase e realiza a troca de dois prótons  $H^+$  presentes no lúmen vesicular por uma molécula de ACh do citoplasma (Nguyen, Cox et al. 1998). Na fenda sináptica, a acetilcolinesterase (AChE) hidrolisa a ACh e a colina liberada é então reciclada após captação pelo transportador de colina de alta afinidade (ChT1) do neurônio colinérgico (Rand, 2007).





**Fig 1.4: Neurotransmissão colinérgica.** Substratos: Ch (colina) e AcCoA (acetilcoenzima A); Enzimas: ChAT (colina acetiltransferase), AChE (acetilcolinesterase); Transportadores: ChT (transportador de colina), VAcHT (transportador vesicular de acetilcolina). Genes: *cha-1* (codifica ChAT), *unc-17* (codifica VAcHT) e *cho-1* (codifica ChT). (Rand, 2007).

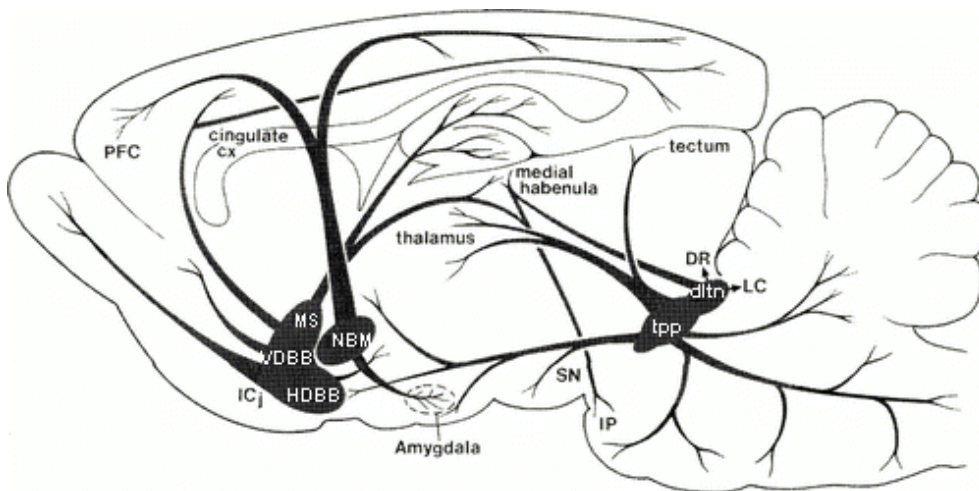
No neurônio pós-sináptico da neurotransmissão colinérgica, existem dois tipos de receptores, os nicotínicos (nAChRs) e os muscarínicos (mAChRs). Os nAChRs são receptores do tipo canal iônico que permitem a despolarização da membrana neuronal devido à sua permeabilidade a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^+$ . Os mAChRs são receptores metabotrópicos acoplados à proteína G e podem ser do tipo excitatório ou inibitório (Vizi e Lajtha, 2008).

### 1.2.2. Sistema Colinérgico no Sistema Nervoso Central

As proteínas ChAT, ChT1 e VAcHT são específicas de neurônios colinérgicos. Logo, estas proteínas tem sido utilizadas como marcadores de neurônios colinérgicos, permitindo a identificação das regiões de síntese de ACh, bem como os alvos centrais de suas inervações (Roghani *et al.*, 1996; Schafer *et al.*, 1998).

Os neurônios colinérgicos centrais encontram-se principalmente no prosencéfalo basal e no mesencéfalo (fig. 1.3), além de interneurônios locais no neocórtex, no

neocórtex e na medula espinhal (Lajtha & Vizi, 2008). Em 1983, Mesulam e colaboradores classificaram os neurônios colinérgicos do SNC do rato, de acordo com a localização do seu corpo celular, de Ch1 a Ch8. Os grupos Ch1-Ch4, presentes no prosencéfalo basal, projetam uma rica inervação para o neocórtex, hipocampo, bulbo olfatório e amígdala. Os grupos pontomesencefálicos Ch5-Ch6, é a principal via de projeção colinérgica fora do prosencéfalo basal, e inervam o mesencéfalo. Já os grupos Ch7 e Ch8 têm inervação limitada, que inclui o núcleo interpeduncular e o colículo superior.



**Fig. 1.5: Distribuição de neurônios colinérgicos e suas projeções, no cérebro de roedores.**

Abreviações: MS septo medial (grupo Ch1); VDBB extremidade vertical da banda diagonal de Broca (grupo Ch2); HDBB extremidade horizontal da banda diagonal de Broca (grupo Ch3); NBM núcleo basal de Meynert (grupo Ch4); tpp núcleo tegmental pedunculo pontino (grupo Ch5); dln núcleo tegmental laterodorsal (grupo Ch6); PFC córtex pré-frontal; DR núcleo dorsal da rafe; LC *locus ceruleus*; IP núcleo interpeduncular; SN substância negra. (Everitt and Robbins 1997)

Diversos estudos vêm investigando o papel do sistema colinérgico, no SNC, sobre a modulação de funções cognitivas, através do uso de antagonistas de receptores muscarínicos, de agonistas nicotínicos, ou da denervação colinérgica, em estruturas envolvidas na consolidação de memórias e na execução de atenção e vigília (Gold, 2003; Hasselmo, 2006).

### 1.2.3. Sistema Colinérgico e Cognição

Diversas evidências vêm demonstrando a importância da participação do sistema colinérgico em processos cognitivos. A ACh participa do processamento de memórias procedurais no estriato, conforme observado no teste de “rotarod” (cilindro giratório) (Carta *et al.*, 2006). Muitos estudos apontam o papel da ACh sobre a formação de memórias explícitas ou declarativas. A injeção de escopolamina, um antagonista de receptores muscarínicos, compromete a memória episódica para o reconhecimento de objetos (Ennaceur e Meliani, 1992; De Bruin e Pouzet, 2006), enquanto a administração de agonistas nicotínicos, por sua vez, é capaz de potencializar essa memória (Puma *et al.*, 1999). As projeções colinérgicas para o córtex perirrinal participam do processamento da memória para o reconhecimento de objetos em ratos (Winters e Bussey, 2005) e também da memória visual em macacos (Tang *et al.*, 1997; Turchi *et al.*, 2005). No hipocampo, a acetilcolina é importante para a formação da memória espacial (Kim e Levin, 1996; Mlshima *et al.*, 2000; Hunsaker *et al.*, 2007) e do condicionamento contextual ao medo (Rogers e Kesner, 2004).

A ACh modula também a capacidade de atenção e vigília, através de inervações colinérgicas do córtex pré-frontal, parietal e somatosensorial (Klinkenberg *et al.*, 2011). No bulbo olfatório, o processamento de pistas olfatórias é modulado pelas projeções colinérgicas, que parecem potencializar a discriminação entre odores quimicamente similares (Linster *et al.*, 2001; Mandairon *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos sugerem a participação do sistema colinérgico na modulação de comportamentos socialmente motivados. Foi observado que camundongos machos apresentam uma redução no tempo de investigação olfatória ao longo de sucessivas apresentações de uma fêmea ovariectomizada em intervalos de 10 minutos. A administração prévia de escopolamina, entretanto, impede esse declínio natural no tempo de investigação do intruso (Winslow e Camacho, 1995). A escopolamina impede também a capacidade de ovelhas reconhecerem seus filhotes, quando injetada em um período de até 8 horas pós-parto (Ferreira *et al.*, 1999). Além disso, o sistema colinérgico parece participar da modulação do comportamento agressivo, através de sua atuação no núcleo da estria terminal, aumentando a latência para a exibição de comportamento defensivo após estimulação elétrica do hipotálamo de gatos (Kono *et al.*, 1986).

A acetilcolina está envolvida também em respostas ao stress, através da regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Foi demonstrado que lesões de neurônios colinérgicos do eixo-septo hipocampal diminui a expressão de RNAm de receptores para glicocorticóides

no hipocampo (Han *et al.*, 2002) e a administração intraperitoneal de nicotina estimula o eixo HPA, com uma resposta de elevação nas concentrações plasmáticas de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), corticosterona e vasopressina de ratos (Rhodes *et al.*, 2001).

### 1.3 Vasopressina

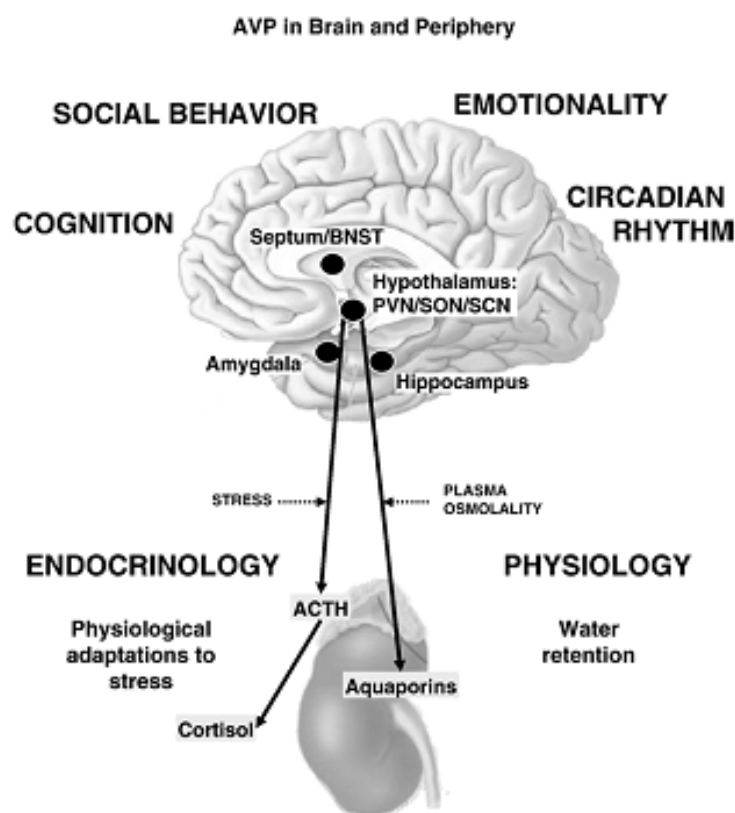
A vasopressina é um neuropeptídeo composto por nove aminoácidos, sintetizado nos núcleos paraventricular (PVN), supraóptico (SON) e supraquiasmático (SCN) do hipotálamo e transportado em vesículas, ao longo de projeções axônicas, até a neurohipófise, de onde é secretado na circulação sistêmica.

As funções periféricas da vasopressina vêm sendo estudadas desde 1895, quando Oliver e Schafer demonstraram, pela primeira vez, a atividade hipertensora de extratos da hipófise. O isolamento e caracterização da vasopressina, realizados por Turner *et al.*, em 1951, permitiram a identificação, de modo específico, das suas funções sistêmicas. Foi verificado que a vasopressina possui ação antidiurética e vasoconstritora, respectivamente, sobre os rins e arteríolas, diante de condições de aumento na osmolaridade plasmática (Ludwig *et al.*, 1994) e queda no volume plasmático por hemorragia (Brown e Ginsburg, 1956).

Dados da literatura demonstram a existência de projeções vasopressinérgicas, bem como a expressão de receptores para vasopressina no SNC. Estudos em roedores e em primatas localizaram projeções de neurônios vasopressinérgicos magnocelulares e parvocelulares, respectivamente, dos núcleos paraventricular e supraquiasmático do hipotálamo, para diversas regiões do SNC, dentre elas, componentes do sistema límbico, como amígdala, hipocampo e septo lateral (Sofroniew, 1980; Sofroniew *et al.*, 1981). Além disso, receptores para vasopressina foram localizados em diversas regiões do encéfalo de roedores, como bulbo olfatório, septo lateral, amígdala, hipocampo, hipotálamo e córtex olfatório (Ostrowski *et al.*, 1994; Hernando *et al.*, 2001).

A observação de alvos centrais de neurônios vasopressinérgicos motivou a investigação dos efeitos da vasopressina sobre o cérebro e diversos estudos então passaram a fornecer evidências da participação deste neuropeptídeo sobre o ritmo circadiano, o comportamento social e respostas emocionais, como a ansiedade. Além disso, a vasopressina participa das respostas do organismo ao stress. A vasopressina originada da região magnocelular do PVN é transportada para a hipófise posterior e, diante de alterações na osmolaridade plasmática, o neuropeptídeo é secretado na circulação sistêmica. A região

magnocelular projeta também para estruturas do sistema límbico, onde a vasopressina medeia o comportamento social. Já a vasopressina oriunda das células da região parvocelular do PVN participa das respostas do eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenais) a estímulos estressores. As células parvocelulares projetam para a hipófise anterior, onde a vasopressina, juntamente com o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), estimula a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), desencadeando na secreção de corticóides pelas glândulas adrenais. (fig 1.4) (Frank e Landgraf, 2008).



**Fig 1.6: Vasopressina no cérebro e na periferia:** Comportamentos mediados pela vasopressina após liberação central no cérebro (comportamento social, cognição, ritmo circadiano) e principais funções sistêmicas da vasopressina após secreção na circulação sistêmica (controle da osmolaridade plasmática, resposta ao stress) estão indicadas. PVN/Son/SCN: núcleos hipotalâmicos de síntese de vasopressina (Frank e Landgraf, 2008).

### 1.3.1. Vasopressina e Comportamento Social

Existem duas espécies de roedores do gênero *Microtus*, na América do Norte, que são geneticamente muito similares, mas apresentam comportamentos sociais opostos. O arganz do campo (*Microtus ochrogaster*) é monogâmico, vive em grupos sociais e apresenta cuidado parental prolongado, enquanto o arganz da montanha (*Microtus Montanus*) possui vida solitária, estabelecendo contato social apenas para fins de procriação. Os estudos que comparam os substratos neurais evocados durante o contato social, nessas duas espécies de roedores, trazem uma relação entre os diversos comportamentos sociais com a distribuição central de receptores vasopressinérgicos (Young, 2002). Além disso, a manipulação genética e a abordagem farmacológica de animais experimentais demonstram que a vasopressina participa da consolidação da memória social de curta duração, da afiliação e da modulação do comportamento agressivo (Insel e Fernand, 2004). Dentre estes estudos, foi demonstrado que animais *knockout* para os receptores V1aR ou V1bR possuem déficit na memória social de curta duração, além de exibirem reduzido comportamento relacionado à ansiedade (Bielsky *et al.*, 2004; Egashira *et al.*, 2009). A administração de antagonista no septo lateral (Bielsky *et al.*, 2005) ou de anticorpo anti-vasopressina na área septal dorsal ou no hipocampo (Greidanus e Maigret, 1996) prejudicam o reconhecimento social de curta duração. Existe também uma população de neurônios vasopressinérgicos no bulbo olfatório cuja atividade parece modular o processamento da informação social nesta estrutura (Tobin *et al.*, 2010). Episódios de privação do contato materno com a prole provocam, nos filhotes, alterações na expressão de células vasopressinérgicas do hipotálamo, além de resultarem em prejuízos na memória social e exacerbarem comportamento agressivo (Todeschin *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2010). Além disso, a administração oral de antagonista de vasopressina (Ferris *et al.*, 2006) inibe o comportamento agressivo. Em conjunto, estes estudos vêm evidenciando um importante papel da vasopressina na modulação dos comportamentos sociais.

### 1.3.2. Sistema Colinérgico e Vasopressina

Alguns dados da literatura sugerem uma possível regulação da acetilcolina sobre a liberação de vasopressina no hipotálamo. Shioda e colaboradores, em 1997, identificaram a presença de receptores nicotínicos no núcleo supraóptico do hipotálamo. A administração *in vitro* local de agonistas nicotínicos aumenta a excitabilidade de neurônios magnocelulares

vasopressinérgicos dos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo (Shen e Shun, 1995; Zaninetti et al., 2002) e a administração *in vivo* intracerebroventricular de agonista muscarínico leva ao aumento de ativação neuronal no hipotálamo e da concentração plasmática de vasopressina (Lauand et al., 2007). Em conjunto, esses trabalhos evidenciam uma modulação positiva da acetilcolina sobre a síntese de vasopressina nos núcleos PVN e SON do hipotálamo.

#### 1.4. Animais *Knockdown* para o Transportador Vesicular de Acetilcolina

Em 2006, Prado e colaboradores caracterizaram um camundongo geneticamente modificado com diminuição (*knockdown*) na expressão do gene que codifica a proteína VACHT. O gene da proteína VACHT fica no primeiro íntron do gene da proteína ChAT (fig1.5). É importante ressaltar, entretanto, que a queda na transcrição de RNAm foi específica para a VACHT, não havendo alteração na expressão nos níveis de RNAm para a ChAT.

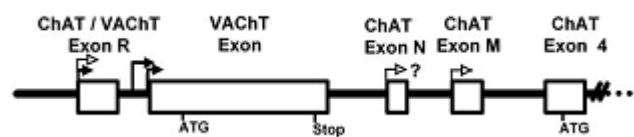


Fig 1.7: Desenho esquemático do gene colinérgico. (Prado et al., 2006).

A análise do córtex cerebral, estriado, medula espinhal e hipocampo revelou que animais VACHT KD heterozigoto ( $KD^{HET}$ ) e VACHT KD homozigoto ( $KD^{HOM}$ ) possuem, respectivamente, uma diminuição de 45-50% e 65-70% na expressão da VACHT, em relação aos animais VACHT *wild type* (WT). A redução na expressão da VACHT teve consequência direta sobre a quantidade de ACh liberada no sistema nervoso central.

Foi observado que apenas os animais VACHT  $KD^{HOM}$  possuem prejuízo na função neuromuscular. Diante disto, o grupo avaliou funções cognitivas apenas de animais VACHT  $KD^{HET}$  e mostrou que estes animais possuem déficit na memória do tipo episódica de curto e longo prazo para o reconhecimento de objetos, além de serem incapazes de reconhecer um indivíduo familiar num curto período após a primeira apresentação.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o efeito da diminuição do tônus colinérgico sobre comportamentos socialmente motivados, bem como a interação entre sistema colinérgico e vasopressina na modulação do comportamento agressivo.

### 2.2. Objetivos Específicos

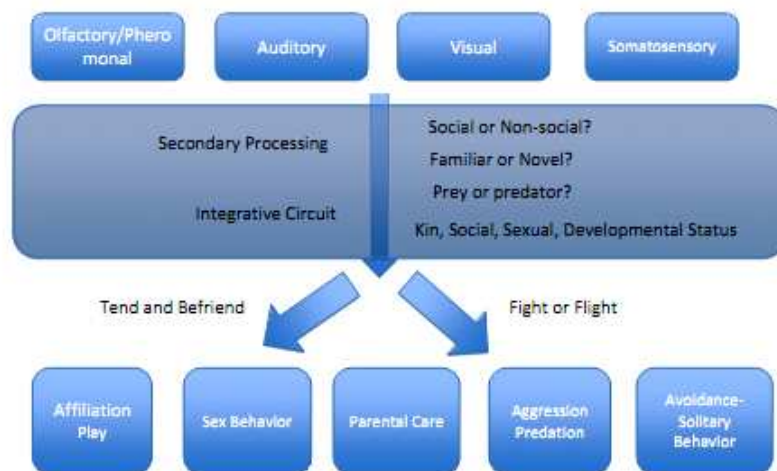
- Avaliar a atividade locomotora e exploratória espontâneas de animais VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HOM</sup>;
- Avaliar a memória social de curta e de longa duração em animais VAC<sub>h</sub>T WT, VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup> e VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HOM</sup>;
- Avaliar o comportamento social agressivo de animais VAC<sub>h</sub>T WT, VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup> e VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HOM</sup>;
- Avaliar o comportamento relacionado à ansiedade em animais VAC<sub>h</sub>T WT, VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup> e VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HOM</sup>;
- Avaliar a função olfatória de animais VAC<sub>h</sub>T WT, VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup> e VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HOM</sup>;
- Verificar o efeito da administração de atropina (antagonista muscarínico) sobre a memória social de animais VAC<sub>h</sub>T WT;
- Testar se a administração de fisostigmina (inibidor de acetilcolinesterase), imediatamente após o aprendizado, é capaz de reverter o déficit na memória social de animais VAC<sub>h</sub>T KD;
- Avaliar a imunoreatividade para vasopressina no hipotálamo de animais VAC<sub>h</sub>T WT, VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup> e VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HOM</sup>;
- Testar se a administração de vasopressina é capaz de reverter possíveis alterações no comportamento agressivo de animais VAC<sub>h</sub>T KD.



### 3. JUSTIFICATIVA

Em 1992, Cacioppo e Berntson propuseram, pela primeira vez, o termo Neurociência Social como um novo campo de estudo para a “Década do Cérebro”.

Nas últimas duas décadas, a neurociência social vem sendo dividida principalmente em estudos que focam na recepção da informação social, ou seja, no processamento sensorial do estímulo, e estudos que focam na resposta comportamental, ou seja, nas interações sociais observadas. Pouco se sabe, entretanto, acerca do processamento secundário da informação social (fig 3.1), em outras palavras, o que ocorre entre a percepção do estímulo social e a iniciação de um comportamento social, quais são os substratos neurais, os neurotransmissores e hormônios envolvidos no processamento secundário da informação social (Insel, 2010).



**Fig 3.1 – Os desafios da Neurociência Social:** O processamento que ocorre entre a entrada sensorial (olfatório/ferormônio, auditório, visual e somatosensório) e a saída comportamental (afiliação, comportamento sexual, cuidado parental, agressividade, esquiva) ainda é pouco compreendido. (Insel).

Algumas doenças psiquiátricas são claramente caracterizadas por uma incapacidade do indivíduo em estabelecer relações sociais, como o autismo e a fobia social. Foi demonstrado que camundongos modelo da doença de Alzheimer apresentam disfunção colinérgica hipocampal e são incapazes de reconhecer um indivíduo familiar em um intervalo de 3 horas após a primeira apresentação (Ohno et al., 2004). A doença de Alzheimer é uma

desordem neurodegenerativa multifatorial em que há uma queda na função colinérgica relacionada com graves comprometimentos cognitivos. Em 2006, Prado e colaboradores demonstraram que animais VAcHT KD<sup>HET</sup> possuem déficit de memória social. Entretanto, esses animais foram previamente isolados, ou seja, permaneceram por um período de quatro dias em gaiolas individuais, e a memória social de longa duração não foi avaliada. Foi demonstrado que o isolamento social, em um período de um dia a sete dias, é um fator ambiental que prejudica o processamento da memória social de longa duração (Kogan et al., 2000). Além disso, o comportamento de animais VAcHT KD<sup>HOM</sup> não foi analisado, já que estes possuem força muscular diminuída. Sabendo que as tarefas para avaliação de reconhecimento social não exigem força muscular, mas sim, atividade locomotora espontânea, a capacidade de locomoção desses animais pode ser avaliada, a fim de se verificar a possibilidade do estudo dos efeitos da redução exacerbada no tônus colinérgico central sobre o comportamento social.

Tendo em vista que a literatura apresenta dados principalmente acerca da memória social de curta duração, com animais previamente isolados, pouco se sabe sobre os substratos neurais envolvidos na formação da memória social de longa duração. Em 2004, van Kampen e cols. observaram que a potencialização da neurotransmissão colinérgica pela administração de metrifonato (inibidor de AChE) melhora o reconhecimento social de longa duração em ratos agrupados. Porém, nenhum estudo foi conduzido para investigar possíveis conseqüências de uma hipofunção colinérgica sobre esta memória.

O papel da vasopressina na modulação de interações sociais tem sido reconhecido, e algumas evidências sugerem a existência de uma modulação da síntese desse neuropeptídeo pela ACh. Todavia, ainda não foram realizadas investigações dos efeitos de um insulto ao sistema colinérgico central, em um modelo *in vivo*, sobre o sistema vasopressinérgico e sua relação com possíveis alterações no comportamento social.

Estudos ainda precisam ser conduzidos para permitir a elucidação das bases neurais da participação do sistema colinérgico sobre o comportamento social. Diante disso, propusemos responder às seguintes perguntas: a ACh participa do processamento da memória social de longa duração? A redução do tônus colinérgico central gera alterações no comportamento social agressivo? A hipofunção colinérgica pode acarretar em um prejuízo no sistema vasopressinérgico hipotalâmico? Para responder à essas perguntas, realizamos testes cognitivos em animais VAcHT *Knockdown*, um modelo de hipofunção colinérgica, além de uma abordagem farmacológica.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos VACHT WT, VACHT KD<sup>HET</sup> e VACHT KD<sup>HOM</sup> com idade entre 8 e 14 semanas, fornecidos pelo Biotério de animais transgênicos do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Também utilizamos animais juvenis (de 25 a 35 dias de idade) provenientes do CEBIO da UFMG, que serviram de intrusos para os experimentos de reconhecimento social. Para a avaliação do comportamento agressivo, utilizamos como intruso animais machos C57 (8 semanas de idade) provenientes do CEBIO da UFMG.

Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12/12 horas em estante ventilada, com temperatura constante de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade 40–70%. Em cada gaiola foram mantidos de 3 a 5 camundongos, com ração e água *ad libitum*.

Todos os protocolos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob número 184/2009.

### 4.2. Teste de atividade exploratória em animais VACHT KD<sup>HOM</sup>

Para avaliar a atividade exploratória de animais VACHT KD<sup>HOM</sup>, cada indivíduo foi inserido em um campo aberto (50cmX50cmX50cm), dividido em 36 quadrantes. Foi permitido ao animal 5 minutos de livre exploração e, durante esse período, foram contados: o número de *crossings*, ou seja, o número de quadrantes cruzados pelo animal, e o número de *rearings*, ou seja, o número de vezes em que o animal suspendia o corpo sobre as patas traseiras. *Crossings* e *rearings* correspondem, respectivamente, à atividade locomotora horizontal e vertical espontâneas.

### **4.3. Tarefa de Reconhecimento Social**

O paradigma da tarefa de reconhecimento social é baseado na tendência natural dos roedores em investigar com maior dedicação um indivíduo intruso quando ele lhe é apresentado pela primeira vez. O animal residente despenderá então menor tempo de investigação sobre o intruso familiar que lhe for posteriormente reapresentado, indicando assim o reconhecimento social (Thor e Holloway, 1982). Este protocolo não exige nenhum tipo de recompensa ou de componente aversivo.

Num primeiro momento, o animal passa por um período de 30 minutos de habituação a uma nova gaiola, idêntica àquela onde é mantido, onde permanece sem perturbações. Em seguida, inicia-se a sessão de treino, na qual é inserido um camundongo estímulo, denominado de intruso. Após a fase de treino, é dado um intervalo de 30min ou 24 horas, para avaliação da memória de curta e longa duração, respectivamente, e realizada a sessão de teste, com a reapresentação do intruso familiar. Ambas sessões de treino e teste tiveram duração de 5 minutos.

Os animais intrusos eram camundongos machos juvenis (25 a 35 dias de idade) da linhagem swiss, e foram apresentados dentro de uma pequena gaiola plástica, contendo cerca de 60 orifícios. A investigação social foi contabilizada toda vez que o animal experimental introduzia o focinho dentro desses orifícios (Prado et al. 2006).

Os resultados foram expressos como tempo total de exploração no treino e no teste, para comparação intra-grupos.

#### **4.3.1. Drogas**

Para avaliar a consequência do bloqueio de receptores muscarínicos em animais VACHT WT na consolidação da MLD social, foi administrada atropina 1mg/kg i.p. dissolvida em salina, ou salina, como controle, imediatamente após o treino.

Para testar se a potencialização da neurotransmissão colinérgica durante a fase de consolidação da MLD social é capaz de reverter o déficit nessa memória, foi administrada fisostigmina (Sigma) 0,3mg/kg i.p. dissolvida em salina, ou salina, como controle, em animais VACHT KD, imediatamente após o treino. Foi demonstrado que esta dose de fisostigmina é capaz de reverter déficit de memória espacial induzido por atropina (Fontana *et al.*, 1995) e de facilitar a memória para esQUIVA passiva (Gower *et al.*, 1987).

#### **4.4. Teste de agressividade**

O teste de agressividade foi precedido de um período de habituação de cada animal por 30 minutos a uma gaiola com maravalha limpa. Animais VACHT WT e VACHT KD tem como *background* animais C57, ou seja, os animais transgênicos foram produzidos a partir da linhagem C57. Sendo assim, os animais intrusos utilizados nesse protocolo foram camundongos machos, adultos, C57, apresentados ao animal experimental após habituação do mesmo. A interação ocorreu durante um tempo total de 10 minutos, dentro dos quais o animal experimental foi observado para identificação de comportamentos agressivos ofensivos e defensivos. Comportamentos agressivos ofensivos foram considerados como mordidas e perseguição, e comportamentos defensivos, como fuga e postura defensiva. Foram contabilizados a latência para a ocorrência do primeiro ataque, o número total de ataques, bem como o tempo total de duração dos ataques. Foram também contabilizados o tempo de comportamento defensivo, o tempo de exploração social olfatória da região anogenital e dorso do animal estímulo, além do tempo de comportamento não social, como *grooming*, *rearing* e exploração do ambiente (Albers *et al.* 2006).

##### **4.4.1 Drogas**

Para avaliar os efeitos da administração de vasopressina sobre o comportamento agressivo de animais VACHT KD, foi aplicada 1,2 µg de vasopressina (RBI – Sigma), dissolvida em 500 µl de salina, ou salina, via subcutânea, 30 minutos antes do teste de agressividade. A dose e via de administração da vasopressina foram previamente utilizadas e demonstraram-se eficazes na potencialização de memória espacial, sendo assim, é capaz de atingir o SNC e atuar sobre a cognição de camundongos (Paban *et al.*, 2003).

#### **4.5. Labirinto em Cruz Elevado**

Para assegurar que os resultados encontrados referentes à memória social não estão relacionados a alterações basais de ansiedade em animais VACHT *Knockdown*, os animais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado. O labirinto em cruz elevado consiste em um aparato elevado 30 cm do solo, com quatro braços (de 30 cm de comprimento cada) que se encontram em um centro, sendo dois braços fechados (30cmX6cm cada) e os outros dois abertos (30cmX6cmX15cm cada). Esta tarefa se baseia na aversão inata de roedores a

ambientes abertos e elevados, sendo freqüentemente utilizada para avaliar comportamento relacionado à ansiedade (Rodgers *et al.*, 1997). O animal é colocado no centro do aparato e, durante 5 minutos, são registrados o número de entradas e o tempo de permanência nos braços fechados e nos braços abertos (Bielsky *et al.*, 2005).

#### **4.6. Teste de Habilidade Olfativa**

Sabendo que o input colinérgico sobre o bulbo olfatório de roedores modula a capacidade olfatória destes animais (Mandairon *et al.*, 2006) verificamos a funcionalidade do sistema olfatório de animais VACHT KD, através do teste de função olfatória. Para isso, foram introduzidos 7 gramas de chocolate, por animal, em cada gaiola, durante 72 horas. Após esse período de habituação, o chocolate foi removido e os animais foram privados de ração por 12 horas. Ao final desse intervalo de tempo, cada animal então foi colocado em uma caixa contendo um pedaço de chocolate escondido sob maravalha limpa e o tempo que o animal levou para encontrar o alimento foi cronometrado (Yang e Crawley, 2009). Os animais foram sempre inseridos na caixa em um ponto diametralmente oposto àquele onde se encontrava o chocolate. O resultado foi expresso como latência de tempo para encontrar o chocolate, em segundos.

#### **4.7. Imunohistoquímica**

A identificação dos neurônios vasopressinérgicos foi realizada através da técnica de imunohistoquímica pelo método indireto da imunoperoxidase com complexo avidina-biotina (Todeschin *et al.*, 2009).

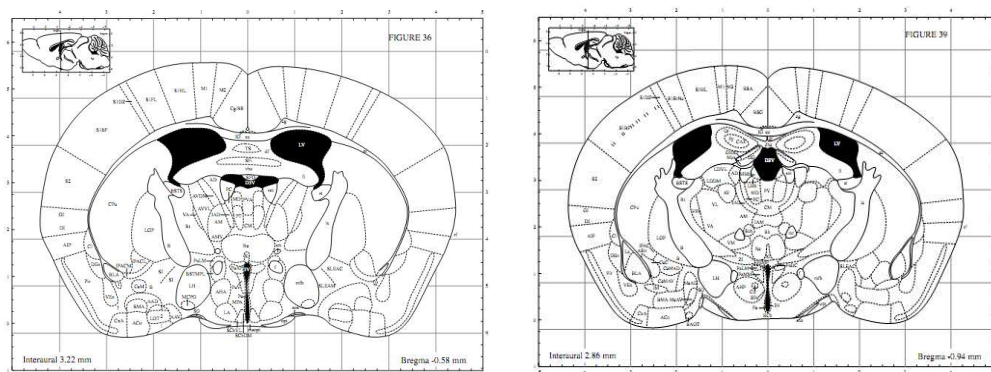
Os animais destinados a este protocolo foram previamente anestesiados com solução de quetamina (80mg/kg) e xilazina (15mg/kg) via i.p. e então submetidos à perfusão intracardíaca, com 20ml de solução de PBS 0,1M, seguida de 40ml de solução de paraformaldeído (PFA) a 4%. Os cérebros foram removidos, pós-fixados em PFA 4% por 12h a 4°C e transferidos para solução de sacarose a 30% por pelo menos 72hs. Para obtenção de cortes coronais, os cérebros foram previamente congelados em isopentano 99% e então fatiados no micrótomo criostato modelo 300, a -18°C, obtendo-se fatias de 40 µm. As fatias então permaneceram em solução crioprotetora a -18°C até o momento da realização da técnica de imunohistoquímica.

O protocolo de imunohistoquímica consistiu na exposição das fatias aos seguintes passos: três lavagens de 6min em PBS 0,1M; uma incubação de 5min em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% em PBS 0,1M; três lavagens de 6min em PBST; uma incubação de 120min em solução de bloqueio com soro de cabra (NGS) a 3% em PBST; uma incubação em anticorpo primário na diluição de 1:100 em solução de bloqueio à 4°C *overnight*. No segundo dia do protocolo, as fatias foram expostas aos seguintes procedimentos: três lavagens de 6min em PBST; uma incubação em anticorpo secundário anti-mouse biotilado na diluição 1:100 em PBST por 120min; três lavagens de 6min em PBST; uma incubação em complexo avidina-biotina (Kit ABC Elite – Vectastain) em PBST por 90min; três lavagens de 6min em PBS 0,1M; uma incubação em solução contendo o cromógeno 3,3'diaminobenzidina-HCl (DAB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% em TBS 0,1M por 15min; três lavagens finais de 6min em PBS 0,1M.

As fatias foram distribuídas em lâminas gelatinizadas e cobertas com lamínulas, utilizando entellan.

#### 4.7.1. Análise das imagens

Para análise quantitativa da marcação do tecido, as fatias correspondentes às coordenadas de -0,58mm a -0,94mm referentes ao bregma (Paxinos e Franklin, 1997) foram previamente identificadas (fig 4.2), selecionadas e fotografadas por meio da visualização das lâminas sob microscópio óptico, em aumento de 10X e 20X.



**Fig. 4.2: Coordenadas estereotáxicas do cérebro de camundongo: -0,58mm e -0,94mm referentes ao bregma (Paxinos e Franklin, 2001).**

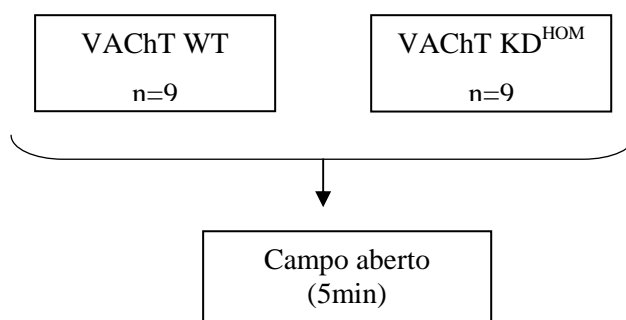
Para análise do número total de células no PVN, foram utilizadas 7 fatias intercaladas, por animal, fotografadas sob aumento de 20X, dentro das coordenadas citadas anteriormente. O número de células imunoreativas foi contabilizado, bilateralmente, com

auxílio do programa Image J. Os resultados são expressos como o número total de células por animal.

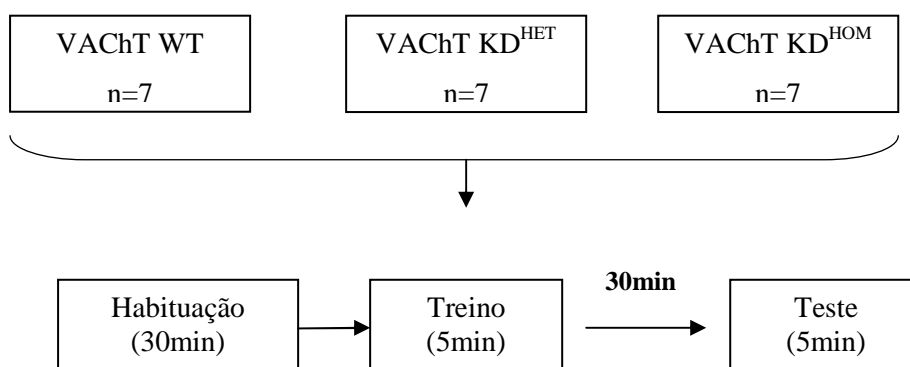
Para análise, separadamente, das regiões magnocelular e parvocelular do PVN, foram selecionadas 3 fatias intercaladas, de -0,82mm a -0,94mm referentes ao bregma, fotografadas sob aumento de 10X. Foi utilizado o programa Image J, com o qual as imagens foram expostas a uma faixa limite de coloração (*threshold* de 0/50 *red*). Após exposição ao *threshold*, as regiões magnocelular e parvocelular foram selecionadas, bilateralmente, gerando um valor, para cada região, da porcentagem de marcação presente em cada fatia. Os resultados são expressos como a média da porcentagem de área marcada.

#### 4.8. Delineamento Experimental

##### Protocolo 1: Avaliação da atividade locomotora espontânea de animais VACHT KD<sup>HOM</sup>

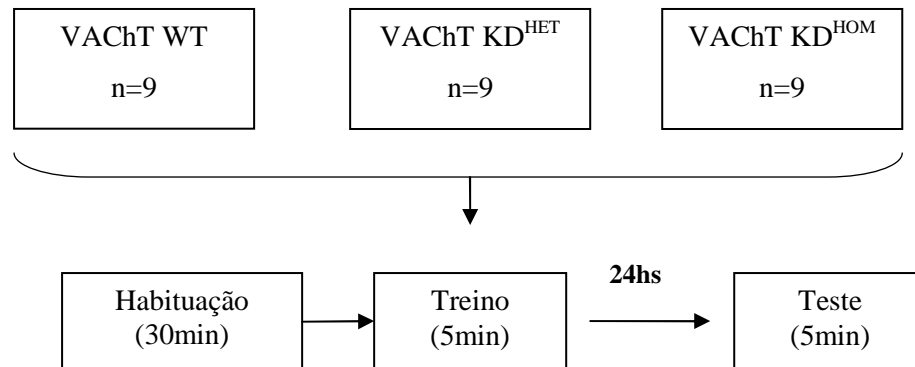


##### Protocolo 2: Avaliação da MCD



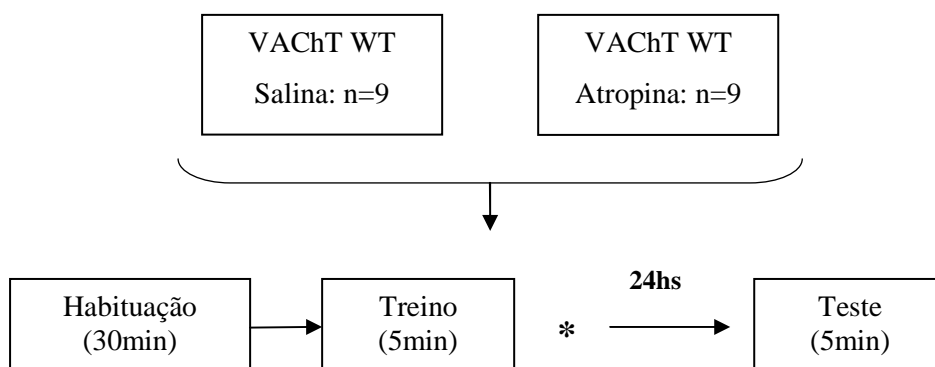


### Protocolo 3: Avaliação da MLD



### Protocolo 4: Avaliação do efeito da administração de atropina sobre a consolidação da MLD

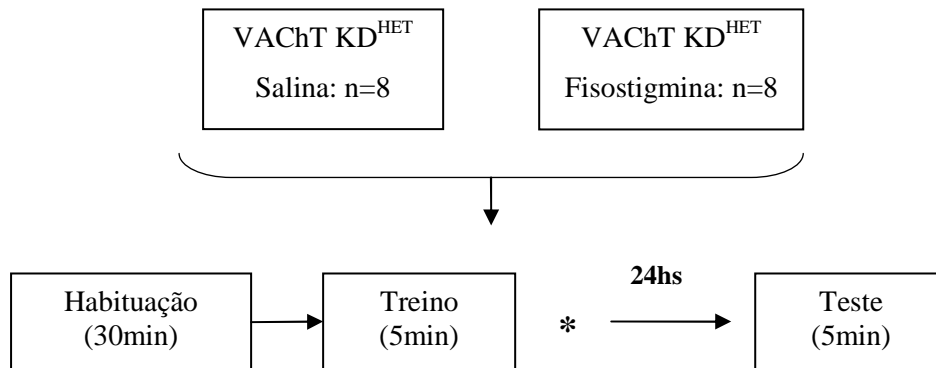
Os mesmos animais VACHT WT utilizados para avaliação da atividade locomotora em campo aberto foram utilizados neste protocolo, distribuídos de maneira homogênea entre os grupos salina e atropina.



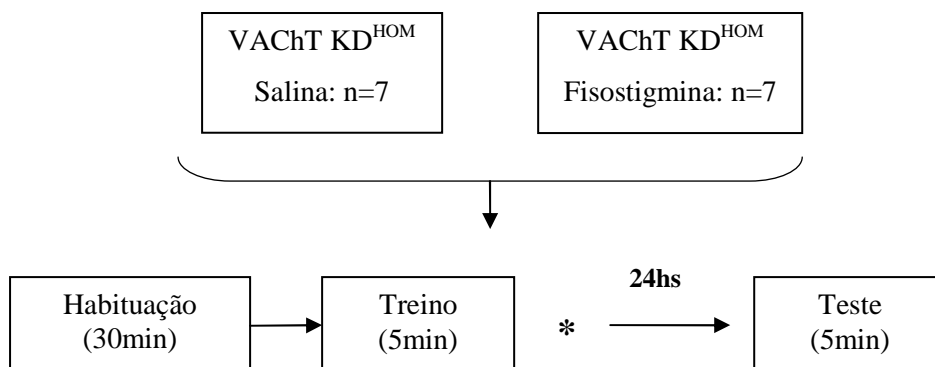
\* Administração salina ou atropina 1mg/kg imediatamente pós-treino.

**Protocolo 5: Avaliação do efeito da administração de fisostigmina sobre a consolidação da MLD de animais VACHT KD**

A.

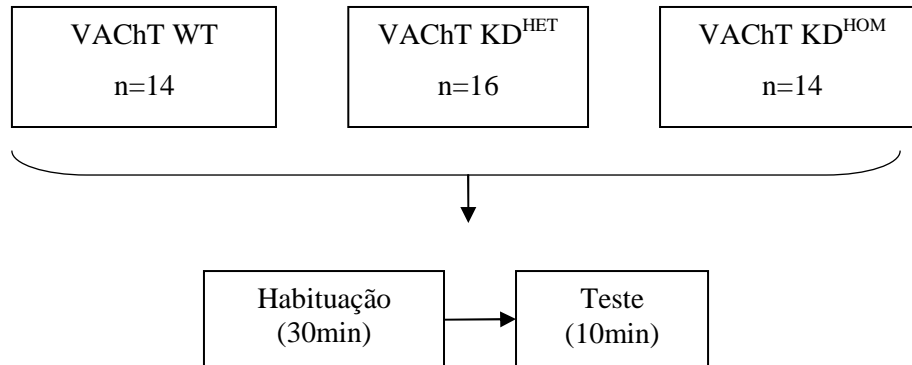


B.



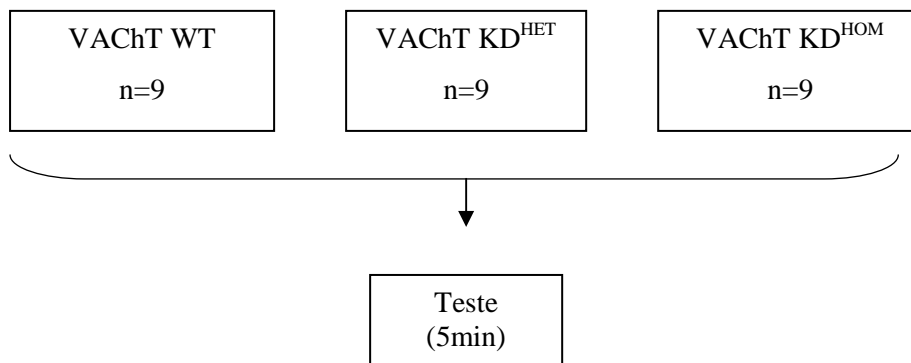
\* Administração salina ou fisostigmina 0,3mg/kg imediatamente pós-treino.

## Protocolo 6: Avaliação do comportamento social agressivo



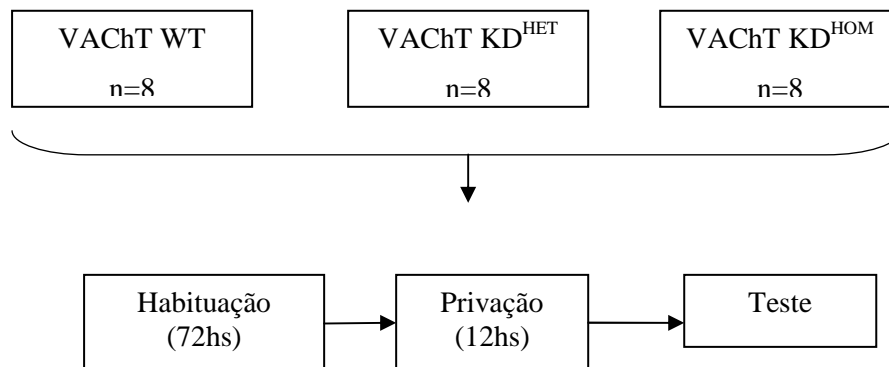
## Protocolo 7: Avaliação do perfil comportamental relacionado à ansiedade

Foram utilizados os mesmos animais anteriormente avaliados na tarefa de reconhecimento social para avaliação de MLD, com intervalo de uma semana.



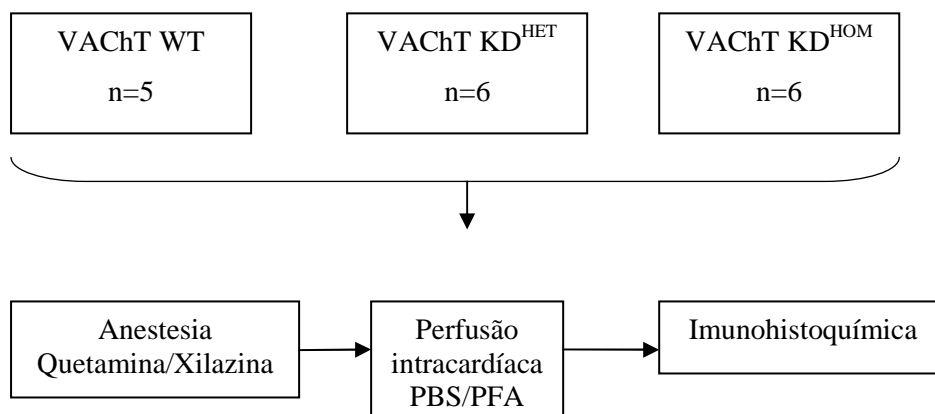
### Protocolo 8: Avaliação da habilidade olfativa

Neste protocolo, foi utilizada parte dos animais anteriormente testados no teste de agressividade, com uma semana de intervalo.

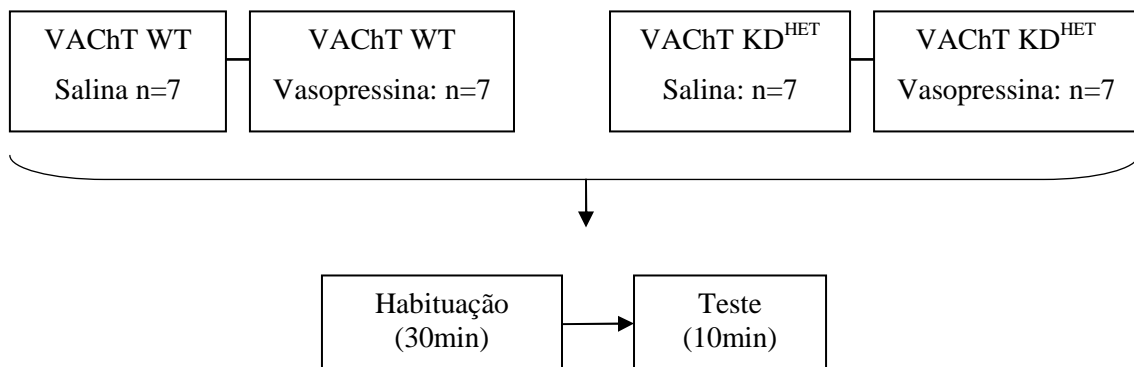


### Protocolo 9: Avaliação de neurônios vasopressinérgicos no PVN

Foram utilizados os mesmos animais anteriormente avaliados na tarefa de reconhecimento para avaliação da MCD, com uma semana de intervalo.



## Protocolo 10: Avaliação do efeito da administração de vasopressina sobre o comportamento social agressivo



### 4.9. Análise Estatística

Todos os dados foram primeiramente avaliados em testes de normalidade de KS e D'Ágostino & Pearson.

A análise estatística dos dados do teste de atividade locomotora espontânea foi realizada através do teste T não-pareado para comparação dos dois grupos utilizados.

O tempo de exploração olfatória, obtido na tarefa de reconhecimento social, foi analisado através do teste T pareado para comparação entre os valores de treino e teste intra-grupo e ANOVA de uma via para comparação entre valores de treino e entre valores de teste inter-grupos, com post-hoc de Bonferroni.

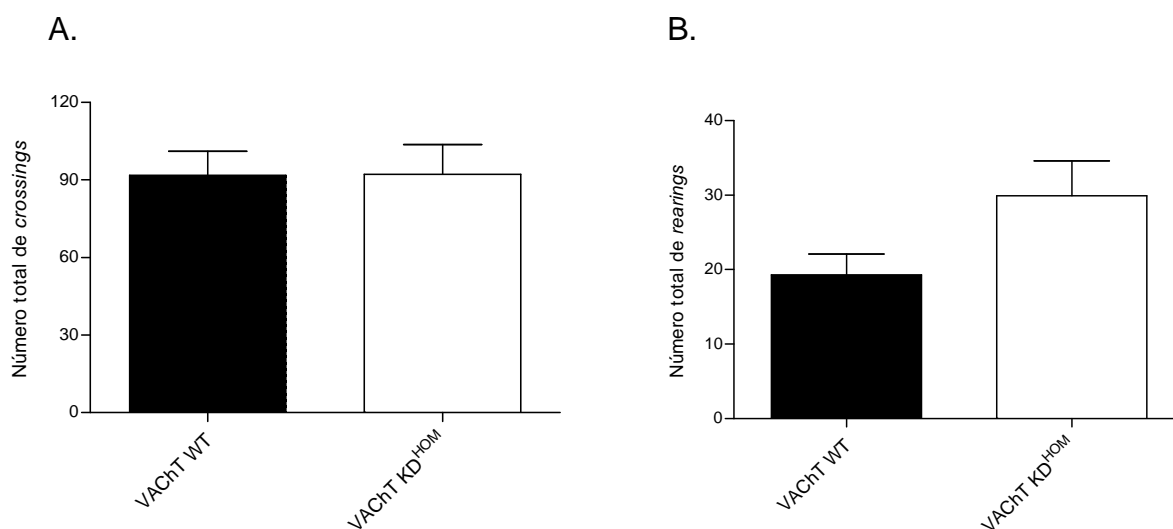
Os resultados referentes ao labirinto em cruz elevado e teste de função olfatória foram analisados através do teste ANOVA de uma via com post-hoc de Tukey, para comparação dos grupos estudados.

A análise estatística do número de ataques e tempo total de ataques observados no teste de comportamento agressivo foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn, pois estes dados não apresentaram distribuição normal.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Atividade locomotora em animais VACHT KD<sup>HOM</sup>

O teste de atividade locomotora revelou que animais VACHT WT e animais VACHT KD<sup>HOM</sup> realizam número de *crossings* ( $t=0,02459$ ;  $p=0,9806$ ) e de *rearings* ( $t=1,934$ ;  $p=0,0674$ ) similares (fig 5.1A e B), não havendo assim diferença entre os grupos quanto à sua atividade horizontal e vertical espontâneas. Sendo assim, podemos afirmar que o grupo VACHT KD<sup>HOM</sup> não apresenta déficit em atividade exploratória dependente de locomoção espontânea.

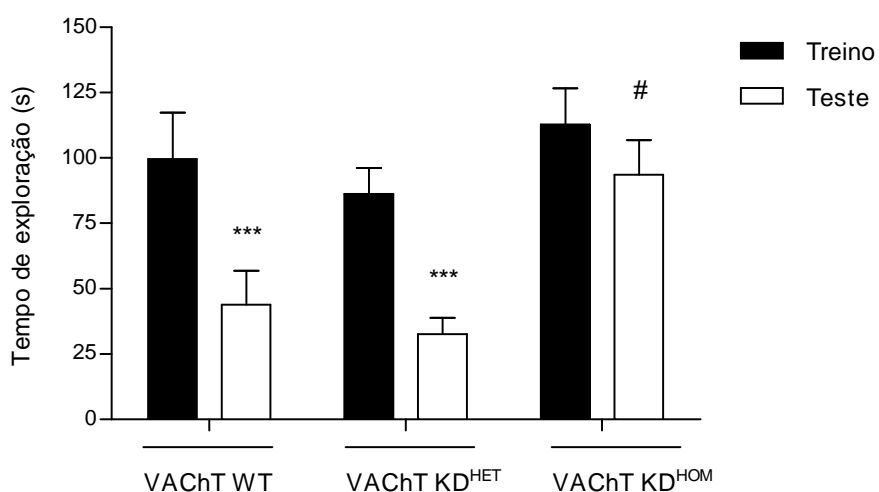


**Fig 5.1: Atividade locomotora espontânea em animais VACHT WT (n=9) e VACHT KD<sup>HOM</sup> (n=9).** (A) Número total de *crossings*. (B) Número total de *rearings*. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM, analisados pelo teste T não-pareado.

Diante do resultado observado, procedemos com os testes cognitivos em animais VACHT KD<sup>HOM</sup>, já que as tarefas às quais os mesmos foram submetidos exigiram uma atividade exploratória dependente de locomoção espontânea e não exigiram força muscular ou atividade física forçada.

## 5.2. Memória social de curta duração em animais VACHT KD

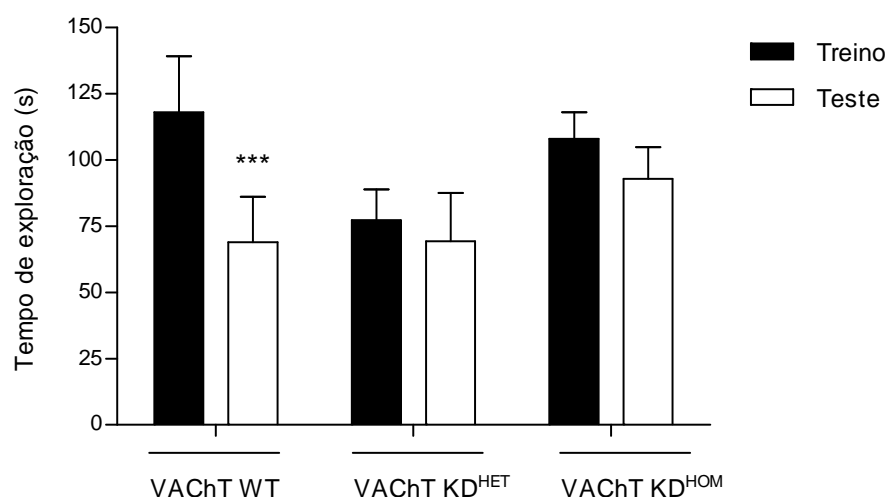
A tarefa de reconhecimento social demonstrou que animais VACHT WT despendem menos tempo na investigação do animal intruso durante o teste, quando comparado com o treino ( $t=8,636$ ;  $p=0,0001$ ). Da mesma maneira, os animais VACHT  $KD^{HET}$  possuem memória social de curta duração intacta, demonstrando menor tempo de investigação olfatória do intruso no teste, em relação ao treino ( $t= 8,343$ ;  $p=0,0002$ ). Os animais VACHT  $KD^{HOM}$ , por sua vez, não são capazes de reconhecer um indivíduo familiar 30 minutos após a primeira apresentação, já que não há diferença entre as barras de teste e treino ( $t= 1,174$ ;  $p=0,285$ ). Além disso, o grupo VACHT  $KD^{HOM}$  dedica maior tempo de investigação do intruso ( $p=0,0028$ ), durante o teste, quando comparado com os outros grupos (fig 5.2).



**Fig 5.2: Memória social de curta duração em animais VACHT WT (n=7), VACHT  $KD^{HET}$  (n=7), VACHT  $KD^{HOM}$  (n=7).** Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p<0,001$  em relação ao treino do respectivo grupo, pelo teste T pareado. #  $p<0,05$  em relação ao teste dos outros grupos, pelo teste one-way ANOVA com post-hoc de Bonferroni.

### 5.3. Memória social de longa duração em animais VACHT KD

Os animais VACHT WT dedicam menor tempo de exploração social do intruso no teste, após intervalo de 24 horas, em relação ao treino ( $t=5,454$ ;  $p=0,001$ ), o que demonstra reconhecimento social de longa duração. Os grupos VACHT  $KD^{HET}$  ( $t=0,5566$ ;  $p=0,5951$ ) e VACHT  $KD^{HOM}$  ( $t=0,8651$ ;  $p=0,4157$ ), por sua vez, possuem déficit na memória social de longa duração, já que não há queda no tempo de investigação social no teste, em relação ao treino (fig 5.3).



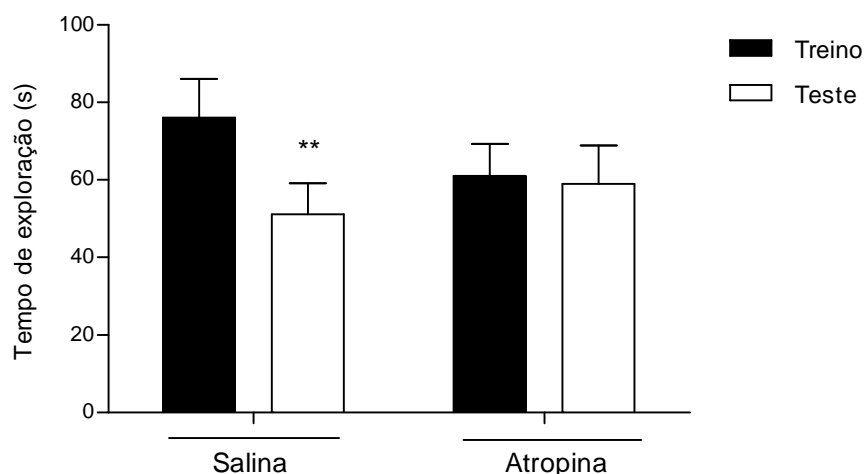
**Fig 5.3: Memória social de longa duração em animais VACHT WT (n=9), VACHT  $KD^{HET}$  (n=9), VACHT  $KD^{HOM}$  (n=9).** O dado é expresso como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p<0,001$  em relação ao treino do respectivo grupo, pelo teste T pareado.

### 5.4. Memória social de longa duração em animais VACHT WT expostos à administração i.p. de atropina

Para verificar o efeito pontual da diminuição do tônus colinérgico sobre a consolidação da memória social de longa duração, animais VACHT WT foram submetidos à administração atropina (1mg/kg), um antagonista muscarínico, imediatamente após a sessão



de treino da tarefa de reconhecimento social. Podemos observar que os animais do grupo salina são capazes de reconhecer um intruso juvenil 24hs após a primeira apresentação, com redução no tempo de investigação olfatória do intruso no teste em relação ao treino ( $t=4,541$ ;  $p=0,0019$ ), o que não ocorre no grupo atropina ( $t=0,3264$ ;  $p=0,7525$ ) (fig 5.4).

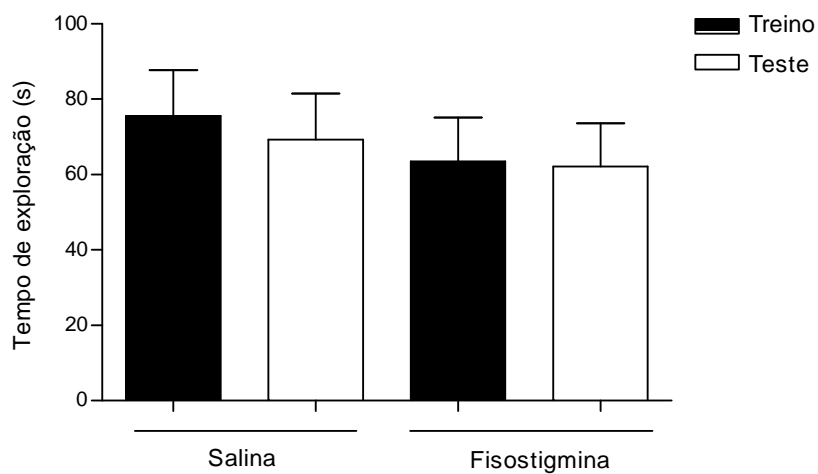


**Fig 5.4: Efeito da atropina na consolidação da memória social de longa duração de animais VACHT WT, divididos em grupos salina (n=9) ou atropina (n=9).** Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*\* $p<0,01$  em relação ao treino, pelo teste T pareado.

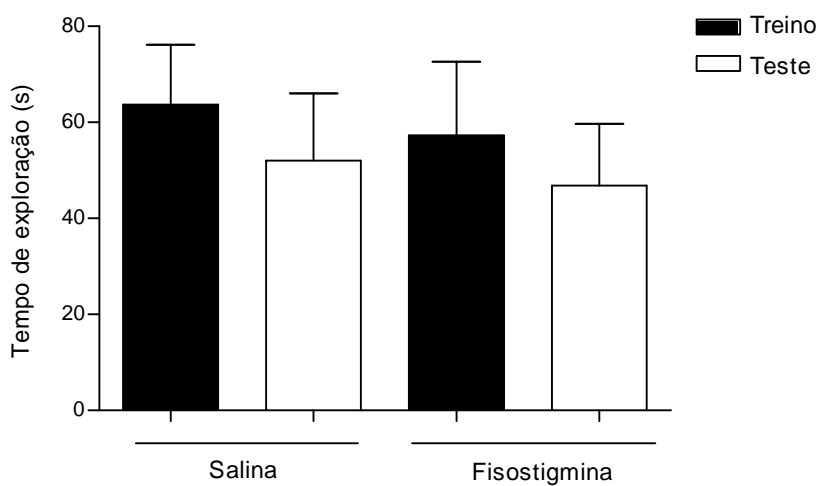
### 5.5. Memória social de longa duração em animais VACHT KD após administração de fisostigmina

No teste de reconhecimento social, observamos que o grupo VACHT KD<sup>HET</sup> salina despense tempos similares de exploração olfatória no treino e no teste ( $t=0,6075$ ;  $p=0,5627$ ), o que também é observado no grupo fisostigmina ( $t=0,2612$ ;  $p=0,8015$ ) (fig 5.5A). No grupo VACHT KD<sup>HOM</sup> também não há diferenças no tempo de exploração no treino e teste, tanto sob administração de salina ( $t=1,898$ ;  $p=0,1064$ ) quanto no grupo fisostigmina ( $t=2,369$ ;  $p=0,0556$ ) (fig5.5B). Sendo assim, a administração de fisostigmina 0,3mg/kg imediatamente após o treino não foi capaz de reverter o déficit na memória social de longa duração de animais VACHT KD.

A.



B.

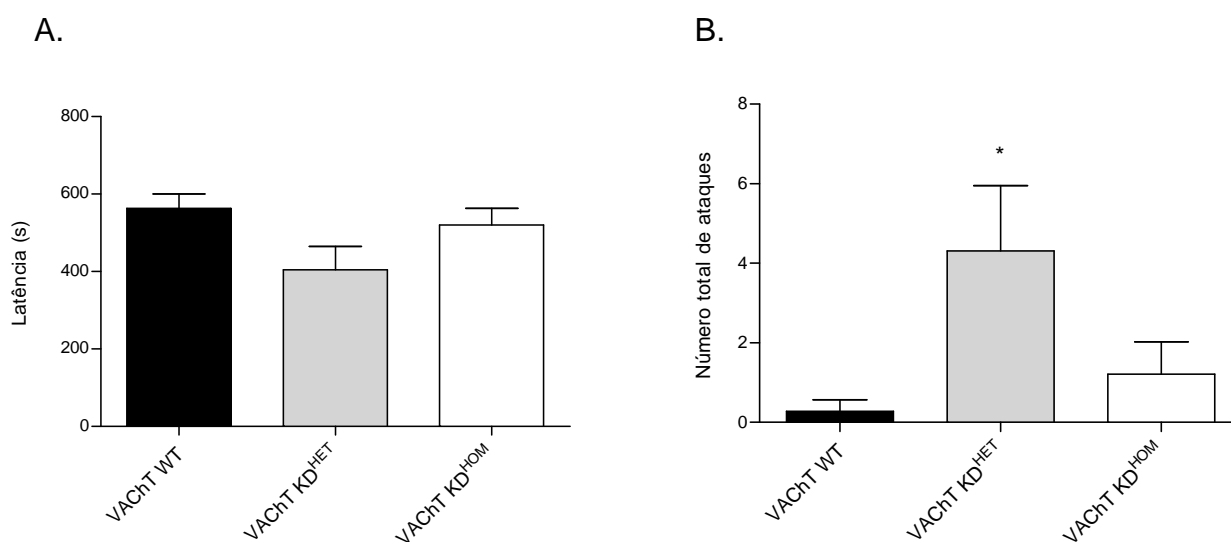


**Fig 5.5: Memória social de longa duração em animais VChT KD:** (A) VChT KD<sup>HET</sup> salina (n=8) e fisostigmina 0,3 mg/kg (n=8); (B) VChT KD<sup>HOM</sup> salina (n=7) e fisostigmina 0,3 mg/kg (n=7). Os resultados são expressos como média ± EPM. Não há diferença entre os tempos de exploração social no treino e teste, dentro de cada grupo, pelo teste T pareado.

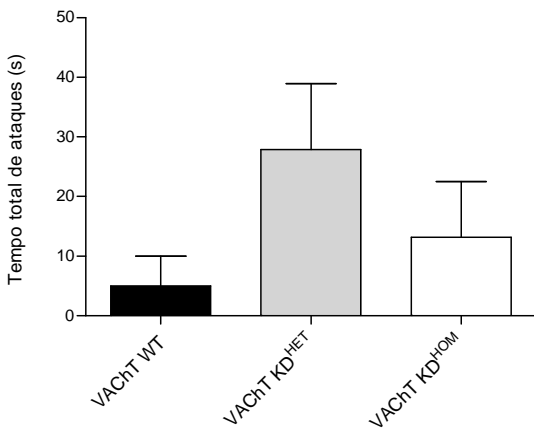
## 5.6. Comportamento social agressivo em animais VACHT KD

Apenas 1 animal do grupo VACHT WT, dentro de uma amostragem de 14 indivíduos, apresentou comportamento agressivo ofensivo, o que corresponde a 7,14% da população. Foi observado que 7 animais VACHT KD<sup>HET</sup>, dentre os 16 indivíduos avaliados, agredem ofensivamente o intruso, o que representa 43,75% do grupo. Já no grupo VACHT KD<sup>HOM</sup>, 3 dentre 14 indivíduos demonstraram comportamento agressivo ofensivo, representando 21,43% da amostragem.

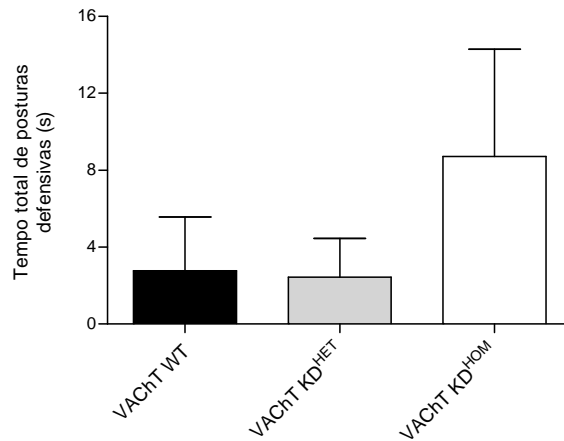
Os animais VACHT KD<sup>HET</sup> apresentam maior número de ataques contra o intruso ( $p=0,0434$ ) quando comparados com os grupos VACHT WT (fig 5.6B). Não existe diferença entre os grupos em relação à latência para a apresentação do primeiro ataque, entretanto, é possível observar que o grupo heterozigoto tende a atacar o intruso dentro de uma menor latência ( $p=0,0573$ ) (fig 5.6A). Não há diferença significativa para o tempo total de ataques contra o intruso, porém há uma tendência em maior tempo de ataques no grupo heterozigoto ( $p=0,0804$ ) (fig 5.6C). Não observamos diferença significativa para o tempo total de exibição de comportamento defensivo, com uma tendência de maior tempo de demonstração de postura defensiva no grupo homozigoto ( $p=0,5531$ ) (fig 5.6D). Os tempos de investigação social olfatória do intruso ( $p=0,0912$ ) (fig 5.6E) e o tempo de investigação não-social ( $p=0,3525$ ) (fig 5.6F) são similares entre os grupos.



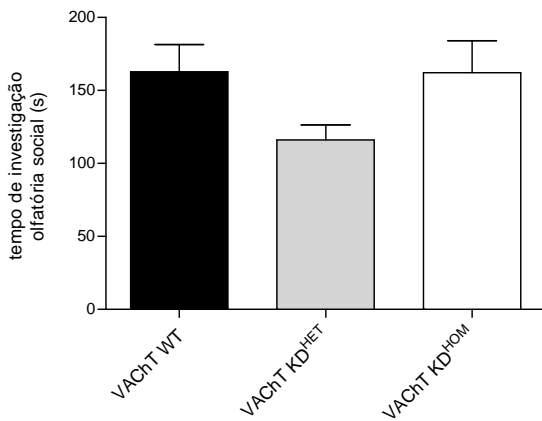
C.



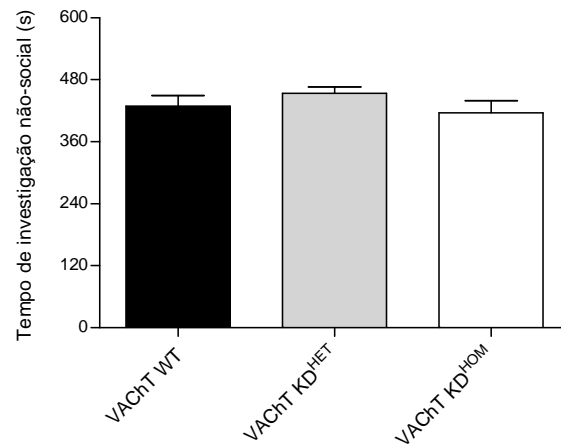
D.



E.



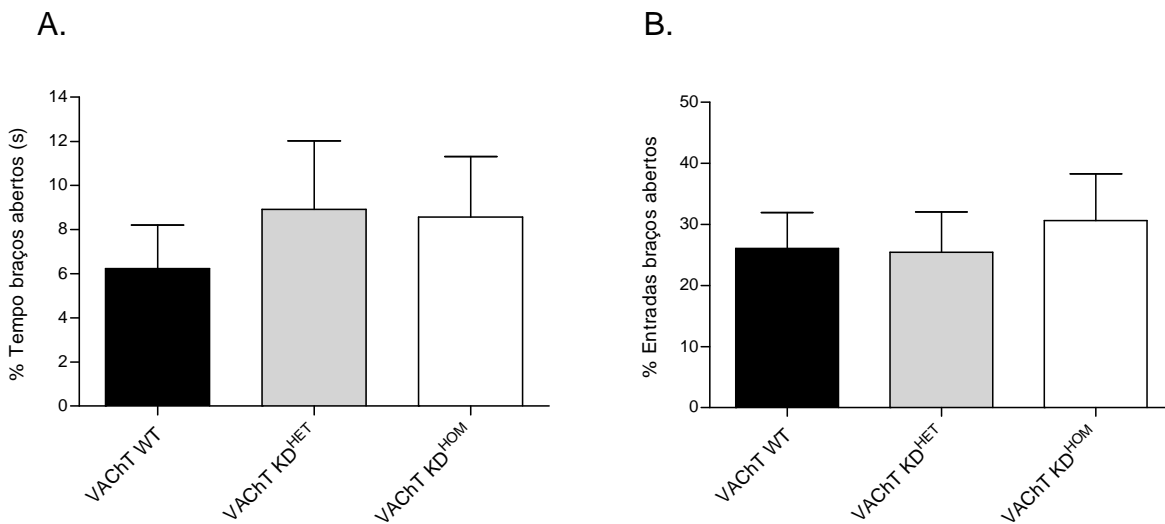
F.



**Fig 5.6: Perfil comportamental de animais VACht WT (n=14), VACht KD<sup>HET</sup> (n=16) e VACht KD<sup>HOM</sup> (n=14) no teste de agressividade:** (A) Latência para o primeiro ataque; (B) Número total de ataques, (C) Tempo total de ataques; (D) Tempo total de posturas defensivas; (E) Tempo de investigação olfatória social; (D) Tempo de investigação não-social. Os resultados são expressos como média ± EPM.\*p<0,05 em relação ao grupo VACht WT, pelo teste Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn ou pelo teste one-way ANOVA com post-hoc de Tukey.

## 5.7. Comportamento relacionado à ansiedade em animais VACHT KD

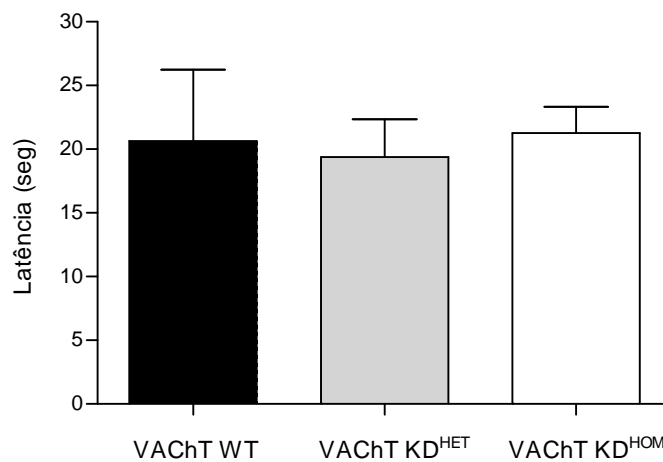
Para avaliar o perfil de comportamento relacionado à ansiedade de animais VACHT KD, submetemos os mesmos ao teste do labirinto em cruz elevado. Os resultados demonstram não haver diferença significativa entre os grupos VACHT WT, VACHT KD<sup>HET</sup> e VACHT KD<sup>HOM</sup>, quanto à porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos ( $F(2,24)=19,28$ .  $p=0,7392$ ) (fig 5.7A) e quanto à porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F(2,24)=73,16$ .  $p=0,8387$ ) (fig 5.7B). Dessa maneira, podemos inferir que os grupos VACHT *knockdown* não possuem alteração nos níveis basais de ansiedade, quando comparados ao grupo VACHT WT.



**Fig 5.7: Perfil comportamental relacionado à ansiedade em animais VACHT WT (n=9), VACHT KD<sup>HET</sup> (n=9), VACHT KD<sup>HOM</sup> (n=9).** (A) Porcentagem de tempo (s) de exploração dos braços abertos e (B) Porcentagem de entradas nos braços abertos. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística pelo one-way ANOVA.

## 5.8. Habilidade olfativa de animais VACHT KD

O teste olfatório demonstrou que animais VACHT KD<sup>HET</sup> e animais VACHT KD<sup>HOM</sup> não possuem déficit de função olfatória, já que dependem uma latência similar ao grupo VACHT WT ( $F(2,21)= 7,292$ .  $p=0,9407$ ) para encontrar um pedaço de chocolate escondida sob maravalha (fig 5.8).

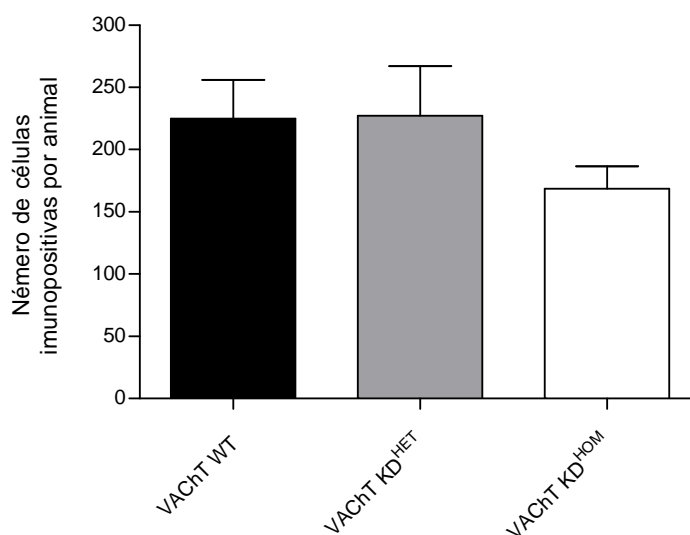


**Fig 5.8: Função Olfatória em animais VACHT WT (n=8), VACHT KD<sup>HET</sup> (n=8), VACHT KD<sup>HOM</sup> (n=8).** Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística pelo one-way ANOVA.

## 5.9. Neurônios vasopressinérgicos em animais VACHT KD

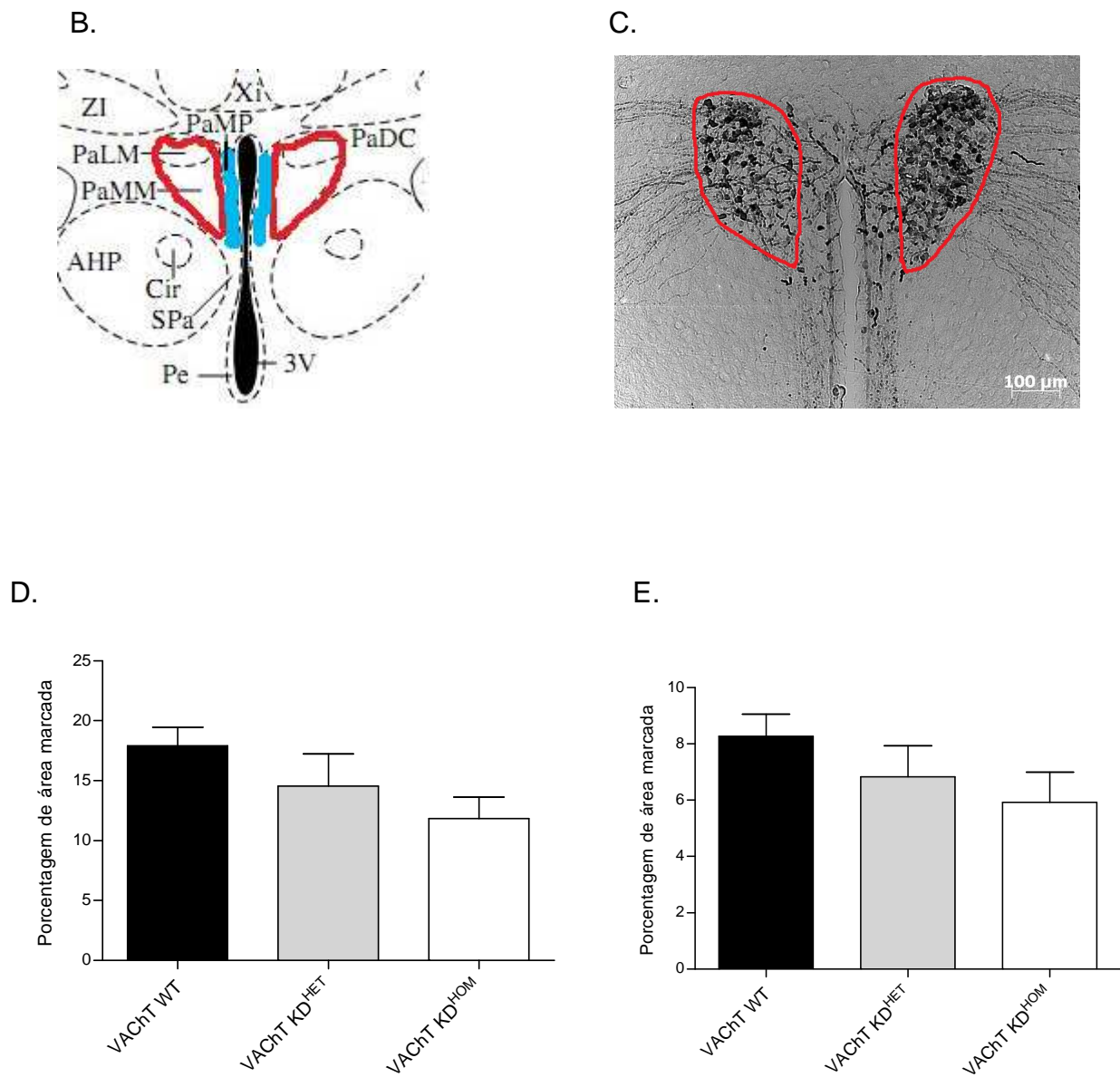
A análise do número total de células imunoreativas para a vasopressina foi realizada, bilateralmente, em 7 fatias intercaladas, no PVN de animais VACHT WT e VACHT KD. Nosso resultado demonstra que animais VACHT WT, VACHT KD<sup>HET</sup> e VACHT KD<sup>HOM</sup> possuem um número similar de células vasopressinérgicas no PVN ( $F(2,16)= 68,13$ ,  $p=0,3812$ ) (fig 5.9A ).

A.



**Fig 5.9A: Número total de células imunopositivas para vasopressina no PVN de animais VACHT WT (n=5), VACHT KD<sup>HET</sup> (n=6) e VACHT KD<sup>HOM</sup> (n=6).** Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística pelo one-way ANOVA com post-hoc de Tukey.

Para análise separadamente da imunoreatividade das regiões magnocelular e parvocelular do PVN, as mesmas foram previamente selecionadas (fig 5.9B e 5.9C). Nosso resultado demonstra não haver diferença significativa na imunoreatividade entre os grupos, tanto na região magnocelular ( $F(2,14)=81,18$ ,  $p=0,088$ ) (fig 5.9D) quanto na região parvocelular ( $F(2,14)=7,765$ ,  $p=0,2966$ ).

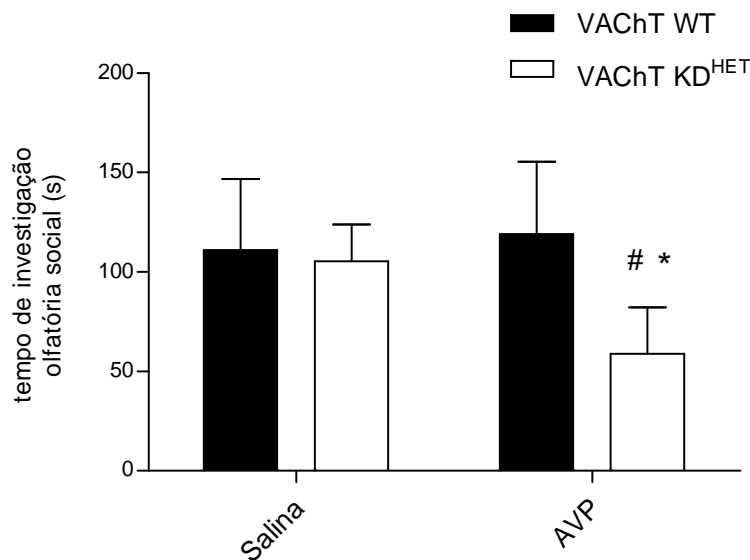


**Fig 5.9: Neurônios vasopressinérgicos em animais VACHT:** (B) Destaque da região magnocelular do PVN, circundada em vermelho e da região parvocelular do PVN, preenchida em azul. PaLM: região magnocelular lateral do PVN ; PaMM: região magnocelular medial do PVN; PaMP: região parvocelular medial do PVN ; 3V: terceiro ventrículo. (C) Imagem de fatia em aumento 10X com região magnocelular do PVN circundada em vermelho. (D) Porcentagem de área marcada, da região magnocelular de animais VACHT WT (n=5), VACHT KD<sup>HET</sup> (n=6) e VACHT KD<sup>HOM</sup> (n=6) após imunohistoquímica anti-vasopressina. (E) Porcentagem de área marcada, da região magnocelular de animais VACHT WT (n=5), VACHT KD<sup>HET</sup> (n=6) e VACHT KD<sup>HOM</sup> (n=6) após imunohistoquímica anti-vasopressina. Os resultados são expressos como média ± EPM. Análise estatística pelo one-way ANOVA com post-hoc de Tukey.



## 5.10. Comportamento social agressivo em animais VACHT KD<sup>HET</sup> após administração de vasopressina

A administração subcutânea de vasopressina nos animais VACHT KD<sup>HET</sup> resultou na anulação do comportamento ofensivo desses animais, já que nenhum animal desse grupo apresentou comportamento de ataque contra o intruso, contra 57,14% de prevalência de animais agressivos no grupo salina. No grupo VACHT WT, a administração de vasopressina não revelou efeito sobre o comportamento agressivo, pois os grupos salina e vasopressina não apresentaram nenhum episódio de agressividade contra o intruso. Além disso, a análise do tempo de investigação olfatória social despendida sobre o intruso, pelo teste two-way ANOVA revelou efeito significativo do tratamento ( $F(1,24)=2,97$ .  $p<0,05$ ) com interação entre os fatores ( $F(1,24)=5,95$ .  $p<0,05$ ), assim, observamos que a vasopressina causa redução da exploração olfatória social no grupo VACHT KD<sup>HET</sup>, quando comparado ao respectivo salina. Além disso, o teste post-hoc de Bonferroni revelou que o grupo vasopressina VACHT KD<sup>HET</sup> despende menor tempo na investigação olfatória social do intruso quando comparado ao grupo vasopressina VACHT WT (fig 5.10).



**Fig 5.10: Comportamento de investigação olfatória social durante o teste de comportamento agressivo, após administração de salina VACHT WT (n=7) e VACHT KD<sup>HET</sup> (n=7) ou vasopressina VACHT WT (n=7) e VACHT KD<sup>HET</sup> (n=7).** Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p<0,05$  pelo two-way ANOVA em relação ao respectivo grupo salina. # $p<0,01$  pelo teste post-hoc de Bonferroni, em relação ao grupo VACHT WT.

## 6. DISCUSSÃO

O papel do sistema colinérgico sobre a cognição vem sendo amplamente estudado. Neste trabalho, nós avaliamos o perfil comportamental do tipo social em camundongos *knockdown* para o transportador vesicular de acetilcolina. Nossos resultados demonstraram que a memória social de curta duração apresenta-se prejudicada em animais VACHT KD<sup>HOM</sup>. Nossos resultados corroboram dados farmacológicos da literatura que mostram que a diminuição de mecanismos pós-sinápticos da neurotransmissão colinérgica pela administração de antagonista muscarínico ou nicotínico prejudica a memória social de curta duração (Van Kampen *et al.*, 2004) e impede o declínio da investigação olfatória natural sobre um intruso após sucessivas apresentações do mesmo em curtos intervalos de tempo de 10 minutos (Wislow e Camacho, 1995).

Demonstramos também um déficit na memória social de longa duração, tanto no grupo VACHT KD<sup>HET</sup> quanto no grupo VACHT KD<sup>HOM</sup>. Estes resultados suportam algumas evidências da importância da acetilcolina sobre o processamento dessa memória. A potencialização da neurotransmissão colinérgica, através da administração de inibidor de acetilcolinesterase ou de agonista nicotínico leva a uma melhora no desempenho de ratos para o reconhecimento social de longa duração (Van Kampen *et al.*, 2004).

Segundo modelo proposto por Hasselmo, 2002, a acetilcolina, em altos níveis, parece modular a aquisição de novas memórias ao potencializar a responsividade do córtex a estímulos sensoriais, enquanto inibe o *feedback* excitatório que medeia a evocação de memórias previamente armazenadas. Dessa maneira, evidências comportamentais da melhora da memória por agonistas nicotínicos devem resultar do aumento do *input* de aferências sensoriais para estruturas corticais onde as memórias são codificadas. A inibição muscarínica sobre o *feedback* excitatório, por sua vez, deve ser responsável pela redução da evocação de memórias antigas, permitindo a codificação de novas informações no córtex.

Observamos que não há alterações no comportamento do tipo ansiedade em animais VACHT KD e nem comprometimento de habilidade olfativa na detecção de um odor. Portanto, podemos inferir que os déficits de memória social observados nos grupos VACHT KD não se devem a alterações nos níveis de ansiedade basal e nem na capacidade de percepção de sinais olfatórios do meio.

Tendo em vista que a memória social de longa duração está prejudicada tanto em animais VACHT KD<sup>HET</sup> quanto em animais VACHT KD<sup>HOM</sup>, enquanto estes últimos apresentam também um déficit da memória de curta duração, podemos questionar quais são

os possíveis mecanismos responsáveis por essa diferença na modulação da MCD e da MLD pelo sistema colinérgico. Foi demonstrado que a administração local de antagonista muscarínico, em diferentes estruturas, pode prejudicar a consolidação da MCD ou da MLD ou de ambas as memórias em uma tarefa de esquivar passiva. Para este tipo de tarefa, foi concluído que a neurotransmissão colinérgica via receptores muscarínicos modula a MCD apenas no hipocampo, enquanto essa modulação colinérgica é observada sobre a MLD não somente no hipocampo, mas também no córtex pré-frontal e amígdala (Izquierdo *et al.*, 2002). Diante disto, é possível que animais VAcHT KD<sup>HET</sup> possuam um declínio colinérgico no córtex pré-frontal e/ou amígdala, justificando o déficit na MLD social e, em contrapartida, teriam a neurotransmissão colinérgica no hipocampo intacta, o que explicaria a apresentação de uma MCD intacta? A resposta para essa pergunta é não, pois estes animais possuem diminuição similar nos níveis da expressão da VAcHT no hipocampo e no córtex (Prado *et al.*, 2006). Por outro lado, nossos dados comportamentais podem estar refletindo um efeito dose-dependente da inibição da neurotransmissão colinérgica sobre o processamento da memória social, já que a administração i.p. de escopolamina prejudica a memória social de curta duração somente em maiores concentrações (Riedel *et al.*, 2009). Seguindo este raciocínio, a hipofunção colinérgica de 45-50% na expressão da proteína VAcHT apresentada pelo grupo VAcHT KD<sup>HET</sup> não seria suficiente para prejudicar a MCD social. Já uma redução mais exacerbada da neurotransmissão colinérgica, de 65-70%, apresentada pelos animais VAcHT KD<sup>HOM</sup> seria capaz de prejudicar essa memória, o que corrobora com dados de Ferreira e cols., de 2001, que mostraram que apenas ovelhas com depleção igual ou maior a 75% dos neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal apresentam déficit no reconhecimento social de seus filhotes em um período de até 4 horas pós-parto, o que não ocorre diante de uma depleção menor que 75%. Interessantemente, as ovelhas que apresentam prejuízo da memória social, assim como os VAcHT KD, não possuem comprometimento da habilidade olfativa para a detecção de odores, porém, a redução da inervação colinérgica do bulbo olfatório está acentuada nesses animais, quando comparada aos animais intactos e aos animais com lesão abaixo de 75% do prosencéfalo basal. Dessa maneira, a investigação da redução da neurotransmissão colinérgica no bulbo olfatório de animais VAcHT KD poderia explicar o prejuízo na MCD encontrado exclusivamente no grupo homocigoto.

O uso de tratamentos farmacológicos ou não-farmacológicos após a fase de treino de uma tarefa é um método eficaz para estudo da consolidação de memórias sem afetar a fase do aprendizado, permitindo a elucidação da participação tempo-dependente de eventos neuroquímicos que levam a retenção de memórias (McGaugh 2000). No nosso trabalho, verificamos que a administração de atropina, um antagonista muscarínico, imediatamente

após o treino na tarefa de reconhecimento social impede o reconhecimento social de longa duração em animais VAcHT WT. Portanto, a ação da acetilcolina, via receptores muscarínicos, é essencial na fase de consolidação da MLD social. Nosso resultado corrobora com o trabalho de Miranda e cols., de 2009, que observou que a administração de escopolamina (antagonista muscarínico), imediatamente após a primeira apresentação de urina de fêmeas, impede o reconhecimento deste odor por ratos machos após 24hs de intervalo. Além disso, diversos dados na literatura evidenciam a importância da ativação de receptores muscarínicos na consolidação de memórias, em estruturas como amígdala, hipocampo, estriado e córtex (Power *et al.*, 2003).

A diminuição da neurotransmissão colinérgica central através da administração i.c.v de um inibidor da síntese de acetilcolina, imediatamente após o treino, prejudica a retenção da memória de longa duração em uma tarefa de esquiva passiva (Baratti *et al.*, 2009). Diante disso, levantamos a seguinte pergunta: O déficit na memória social de longa duração de animais VAcHT KD pode ser revertido através da potencialização da neurotransmissão colinérgica na fase de consolidação dessa memória? Para responder à essa questão, administramos fisostigmina 0,3mg/kg em animais VAcHT KD imediatamente após o treino da tarefa de reconhecimento social. O resultado demonstrou que a administração de fisostigmina não foi capaz de reverter o déficit na memória social de longa duração tanto do grupo VAcHT KD<sup>HOM</sup> quanto do grupo VAcHT KD<sup>HET</sup>. Sabendo que altos níveis de acetilcolina são necessários na fase de aprendizado (Hasselmo 2006), é possível que o comprometimento da disponibilidade de acetilcolina durante a fase de aquisição da memória social de animais VAcHT KD tenha um papel crucial no déficit de memória observada nesses animais. Dados não publicados do grupo do prof. Dr. Marco Prado revelam que animais VAcHT KD<sup>HOM</sup>, quando expostos por 120 minutos a um campo aberto, apresentam menor redução na atividade locomotora com o decorrer do tempo, quando comparados a animais VAcHT WT. Essa diferença não foi observada entre camundongos selvagens e heterozigotos. Além disso, quando submetidos a apresentações sucessivas ao campo aberto, em intervalo de tempo de 24 horas, os camundongos selvagens apresentam decréscimo na atividade locomotora ao longo das sessões, o que não é observado no grupo VAcHT KD<sup>HOM</sup>. Podemos observar, nos nossos dados, uma tendência de aumento na apresentação de *rearings*, ou seja, atividade exploratória vertical do ambiente, no grupo homozigoto em relação ao selvagem. Apesar de não haver diferença significativa na atividade locomotora e exploração espontâneas entre os grupos, é importante ressaltar que estes animais foram expostos ao campo aberto por um período de apenas 5 minutos, contra os 120 minutos avaliados pelo grupo do prof Prado. Sendo assim, é possível que um período de 5 minutos não seja suficiente para observar diferença significativa, com

hiperlocomoção dos VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HOM</sup>. O comportamento de hiperlocomoção apresentado pelos animais VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HOM</sup> representam uma clara redução na habituação intra e entre sessões ao campo aberto. Outros trabalhos também apontam a importância do tônus colinérgico para a habituação a um ambiente (Thiel *et al.*, 1998; Lamprea *et al.*, 2003). Portanto, é possível que a ausência do efeito da administração da fisostigmina pós-treino, em camundongos homocigotos, seja resultante do comprometimento da sua capacidade de habituação, o qual deve ser um componente importante na geração do déficit de memória social apresentado por esses animais.

Os prejuízos cognitivos observados em animais transgênicos podem refletir alterações no desenvolvimento do indivíduo ao invés de um prejuízo na plasticidade na vida adulta do indivíduo (Chapman, 2002). Sendo assim, a falta de eficácia no tratamento de camundongos VAC<sub>h</sub>T KD com fisostigmina pode ser uma consequência do comprometimento do desenvolvimento neurológico desses animais e não um efeito pontual da diminuição da disponibilidade de acetilcolina no momento do processamento da memória. De acordo com essa ideia, dados da literatura demonstram que a perda de neurônios colinérgicos no prosencéfalo basal, pela injeção imunotoxina 192 IgG-saporina em animais neonatos, pode resultar em uma redução do *input* colinérgico sobre o córtex, causando atrasos no desenvolvimento neuronal, mudanças permanentes na morfologia e na conectividade dessa estrutura, além de danos cognitivos na memória e na função atencional na vida adulta dos indivíduos (Berger-Sweeney 2003). Outra possibilidade que deve ser ressaltada é a de que o momento na qual a fisostigmina foi administrada, imediatamente pós-treino, pode não ter sido eficaz para reverter o déficit de memória social de longa duração dos animais VAC<sub>h</sub>T, atuando apenas na consolidação da memória. A injeção de galantamina e de donepezil, ambos inibidores de acetilcolinesterase, 30 minutos pré-treino (Castro *et al.*, 2009) revertem o déficit para a memória de objetos em animais VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup>, ou seja, atuaram na fase de aquisição e consolidação da memória. Sendo assim, estudos posteriores são necessários para avaliar a efetividade da fisostigmina, administrada pré-treino, na reversão do déficit de memória social dos animais VAC<sub>h</sub>T KD.

Pouco se sabe sobre o papel da acetilcolina na modulação do comportamento agressivo. As medidas de comportamento agressivo em roedores são usualmente realizadas através de uma análise da proporção de animais agressivos dentro de uma amostragem, da latência para o primeiro ataque e da duração dos ataques contra o intruso. No nosso estudo, não observamos diferença significativa entre os grupos VAC<sub>h</sub>T WT e VAC<sub>h</sub>T KD quanto à latência para o primeiro ataque e a duração dos ataques. Porém, demonstramos que a prevalência de animais que exibem comportamentos ofensivos no grupo VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup> é seis vezes maior (43,75% da amostragem) que no grupo VAC<sub>h</sub>T WT

(7,14% da amostragem), além de apresentarem maior número de ataques contra o intruso, quando comparado com o grupo selvagem. O grupo VACHT KD<sup>HOM</sup> (21,43% da amostragem) apresenta uma proporção três vezes maior que o grupo selvagem, mas não há diferença significativa entre esses grupos quanto ao número de ataques direcionado contra o intruso, o que pode refletir o prejuízo na força muscular dos animais homocigoto. Em geral, nossos dados evidenciam um comportamento agressivo exacerbado em animais que possuem uma diminuição do tônus colinérgico.

Foi demonstrado que quando um camundongo macho co-habita com uma fêmea, a inserção de um intruso evoca o comportamento agonístico no animal residente. A administração de escopolamina ao animal residente suprime seus episódios ofensivos diante do intruso, de uma maneira dose-dependente (Yoshimura and Ogawa 1982), sugerindo assim que a acetilcolina, atuando em receptores muscarínicos, pode ter um papel fundamental na expressão do comportamento agressivo ofensivo. Sendo assim, nossos resultados referentes à elevada agressividade diante de uma deficiência colinérgica nos animais VACHT KD contrapõem os dados de Yoshimura e Ogawa, 1982, que sugere um efeito estimulante da acetilcolina sobre o comportamento agressivo. Entretanto, não podemos excluir a possibilidade da presença de mecanismos compensatórios para a redução do tônus colinérgico nos animais VACHT KD, dentre eles, uma elevação de receptores nicotínicos e/ou muscarínicos centrais. Se essa idéia for verdadeira, o aumento na expressão de receptores muscarínicos poderia ser responsável pelo exacerbado comportamento ofensivo nesses animais. Além disso, é possível que a diminuição da inervação colinérgica para o córtex seja um ponto importante na exacerbação do comportamento agressivo de animais VACHT KD, pois foi observado que a lesão do córtex pré-frontal de ratos resulta em um aumento na agressividade (de Bruin *et al.*, 1983), indicando que redes corticais superiores tem efeitos inibitórios na expressão do comportamento agressivo.

Por outro lado, verificamos uma ausência de diferença entre os grupos VACHT WT e VACHT KD em relação ao tempo total de posturas defensivas. Nossos resultados corroboram dados na literatura que sugerem que o comportamento agressivo ofensivo e o comportamento agressivo defensivo recrutam diferentes substratos neurais (Adams 2006), assim, a hipofunção colinérgica deve acarretar em alterações da via de sinalização de estruturas envolvidas especificamente com o comportamento ofensivo.

Algumas evidências sugerem uma relação entre o déficit colinérgico com alterações no sistema serotoninérgico de pacientes portadores da doença de Alzheimer, como a presença de polimorfismos no receptor de serotonina. Alterações na expressão de receptores de serotonina, em diversas regiões do SNC, vêm sendo apontadas como um

possível mecanismo modulatório do comportamento agressivo e da ansiedade, porém essa complexa relação ainda não foi bem elucidada (Zarros *et al.*, 2005). Foi sugerido que a ansiedade regula a agressividade ofensiva, de modo que a elevação dos níveis de ansiedade leva a uma inibição do comportamento agressivo (Maestriperi *et al.*, 1991) enquanto baixos níveis de ansiedade levam a um aumento no comportamento agressivo (Veenema *et al.*, 2007). Entretanto, a expressão elevada na agressividade dos animais VACHT KD não pode ser justificada por uma redução na ansiedade desses animais, conforme verificamos pelo teste do labirinto em cruz elevado.

A literatura traz diversas evidências de uma participação crucial da vasopressina em interações sociais. Foi observado, por exemplo, que alterações no ambiente social durante a infância pode provocar prejuízo na memória social, além de diminuição no número de células vasopressinérgicas no PVN na vida adulta desses animais (Tanaka *et al.*, 2010). Diante de estudos que sugerem a regulação da síntese de vasopressina pela acetilcolina, realizamos, através da técnica de imunohistoquímica, a análise da imunoreatividade para vasopressina no PVN do hipotálamo de animais VACHT KD. Nossos resultados não revelaram diferença significativa no número de células vasopressinérgicas entre os grupos VACHT KD e VACHT WT. Sendo assim, é possível que a redução no tônus colinérgico não acarrete em uma alteração dos níveis basais de vasopressina no hipotálamo. Entretanto, essa afirmativa só pode ser confirmada com uma análise quantitativa da expressão da vasopressina, por exemplo, por técnicas como Western Blot ou Elisa. É possível ainda que a acetilcolina não module o estoque de vasopressina no hipotálamo em condições basais, mas sim a liberação da vasopressina diante de um estímulo, sendo assim estudos posteriores são necessários para avaliar a liberação central de vasopressina nesses animais, durante a interação social.

No nosso trabalho, demonstramos que a administração de vasopressina reverteu a exacerbação do comportamento agressivo ofensivo dos animais VACHT KD<sup>HET</sup> e não teve efeito sobre o comportamento de animais VACHT WT. É possível que a vasopressina esteja atuando sobre o núcleo da estria terminal, onde este neuropeptídeo parece exercer uma ação inibitória sobre o comportamento ofensivo entre machos (Veenema *et al.*, 2007). Entretanto, a vasopressina diminuiu o tempo de investigação sobre o intruso, exclusivamente no grupo heterozigoto. Esse efeito genótipo-dependente da vasopressina pode sugerir uma alteração na expressão dos receptores centrais desse neuropeptídeo nos animais VACHT. Animais que foram submetidos a um período de 3 semanas de isolamento social mostram-se mais agressivos, com maior número de ataques e tempo de agressão contra um intruso, além de possuírem maior expressão de receptores V1a no hipotálamo anterior, uma região reconhecida pela promoção do comportamento ofensivo (Albers *et al.*,

2006) Extrapolando nossos dados, podemos imaginar que, se a redução na neurotransmissão colinérgica for capaz de promover uma diminuição na síntese de vasopressina, mecanismos compensatórios, como o aumento na expressão de receptores de vasopressina, incluindo o hipotálamo anterior, podem estar presentes nos camundongos VACHT KD, o que poderia colaborar para a exacerbação do comportamento ofensivo desses animais.

Além disso, a acetilcolina participa da modulação do eixo HPA. Foi demonstrado que lesões de neurônios colinérgicos do eixo-septo hipocampal diminuí a expressão de RNAm de receptores para glicocorticóides no hipocampo (Han *et al.*, 2002) e a administração intraperitoneal de nicotina estimula o eixo HPA, com uma resposta de elevação nas concentrações plasmáticas de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), corticosterona e vasopressina de ratos (Rhodes *et al.*, 2001). O eixo HPA é responsável pelas respostas adaptativas do organismo diante de um estímulo estressor, sendo essencial na manutenção da homeostase do organismo (Pacak e Palkovits, 2001). Halász e cols., em 2002, observaram que a hipofunção glicocorticóide, através da adrenalectomia, por si só, aumentou a atividade da região parvocelular do PVN e da amígdala central, regiões envolvidas em respostas ao stress e medo. Estes animais demonstram exacerbação do comportamento agressivo, direcionando ataques a regiões vulneráveis, como a cabeça, de um intruso, além de uma ativação ainda maior da amígdala central após o encontro, quando comparado a animais normais. O tratamento agudo com corticosterona, antes da apresentação do intruso, aboliu os efeitos comportamentais e neurais da adrenalectomia. O autor discute que o ataque a regiões vulneráveis de um oponente ocorre em situações de perigo, como observado quando um rato se encontra diante de uma colônia não familiar de ratos machos ou diante de um gato. Sendo assim, a resposta do animal com hipofunção glicocorticóide foi imprópria para o estímulo apresentado. Esses achados sugerem que os glicocorticóides devem atuar na manutenção de uma relação normal entre o estímulo percebido e a resposta, provavelmente diminuindo agudamente a ativação de estruturas envolvidas com o medo. Se animais VACHT KD possuírem uma disfunção do eixo HPA, decorrente de uma hipofunção colinérgica, seria possível que eles apresentem uma ativação elevada de estruturas envolvidas com o medo, como a amígdala central, o que justificaria seu aumento no comportamento agressivo. A administração de vasopressina então, poderia estar inibindo o comportamento agressivo de animais VACHT KD<sup>HET</sup> através da ativação do eixo HPA, com liberação de glicocorticóides e conseqüente regulação da resposta agressiva pela inibição das regiões envolvidas com o medo.

Em conjunto, esse trabalho demonstrou importante modulação do sistema colinérgico central sobre o processamento da memória social de curta e longa duração, do



comportamento agressivo ofensivo, além de sugerir uma relação entre o sistema colinérgico e o sistema vasopressinérgico sobre a expressão do comportamento agressivo. Futuros experimentos ainda são necessários para elucidar em quais substratos neurais a acetilcolina atua para modular o comportamento social.

## 7. CONCLUSÕES

- Animais VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup> e VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HOM</sup> apresentam prejuízo na MLD social.
- Somente o grupo VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HOM</sup> possui prejuízo na MCD social.
- A capacidade olfativa para odores não-sociais está intacta nos animais VAC<sub>h</sub>T KD.
- Animais VAC<sub>h</sub>T KD não exibem alterações no comportamento do tipo ansiedade.
- A atropina impede a consolidação da MLD social em animais VAC<sub>h</sub>T WT.
- A fisostigmina pós-treino é incapaz de reverter o déficit na MLD social de animais VAC<sub>h</sub>T KD.
- Animais VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup> apresentam comportamento agressivo ofensivo exacerbado.
- Não há alterações na imunoreatividade para vasopressina na região magnocelular do PVN de camundongos VAC<sub>h</sub>T KD.
- A vasopressina reverte o aumento da expressão de agressividade ofensiva em animais VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup>.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D. B. Brain mechanisms of aggressive behavior: an updated review. Neurosci Biobehav Rev, v.30, n.3, p.304-18. 2006.
- Albers, H. E., A. Dean, *et al.* Role of V1a vasopressin receptors in the control of aggression in Syrian hamsters. Brain Res, v.1073-1074, Feb 16, p.425-30. 2006.
- Baratti, C. M., M. M. Boccia, *et al.* Pharmacological effects and behavioral interventions on memory consolidation and reconsolidation. Braz J Med Biol Res, v.42, n.2, Feb, p.148-54. 2009.
- Benito, E. e A. Barco. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. Trends Neurosci, v.33, n.5, May, p.230-40. 2010.
- Berger-Sweeney, J. The cholinergic basal forebrain system during development and its influence on cognitive processes: important questions and potential answers. Neurosci Biobehav Rev, v.27, n.4, Sep, p.401-11. 2003.
- Bielsky, I. F., S. B. Hu, *et al.* The V1a vasopressin receptor is necessary and sufficient for normal social recognition: a gene replacement study. Neuron, v.47, n.4, Aug 18, p.503-13. 2005.
- \_\_\_\_\_. Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. Neuropsychopharmacology, v.29, n.3, Mar, p.483-93. 2004.
- Brown, L. M. e M. Ginsburg. Effect of anaesthetics and haemorrhage on the release of neurohypophysial antidiuretic hormone. Br J Pharmacol Chemother, v.11, n.3, Sep, p.236-44. 1956.
- Carta, M., R. Stancampiano, *et al.* Vitamin A deficiency induces motor impairments and striatal cholinergic dysfunction in rats. Neuroscience, v.139, n.4, p.1163-72. 2006.
- Chapman, P. F. Giving drugs to knockout mice: can they do that? Trends Neurosci, v.25, n.6, Jun, p.277-9. 2002.
- De Bruin, J. P., H. G. Van Oyen, *et al.* Behavioural changes following lesions of the orbital prefrontal cortex in male rats. Behav Brain Res, v.10, n.2-3, Dec, p.209-32. 1983.
- De Bruin, N. e B. Pouzet. Beneficial effects of galantamine on performance in the object recognition task in Swiss mice: deficits induced by scopolamine and by prolonging the retention interval. Pharmacol Biochem Behav, v.85, n.1, Sep, p.253-60. 2006.
- Dulac, C. e A. T. Torello. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. Nat Rev Neurosci, v.4, n.7, Jul, p.551-62. 2003.
- Egashira, N., K. Mishima, *et al.* New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: role of the vasopressin receptor in psychological and cognitive functions. J Pharmacol Sci, v.109, n.1, Jan, p.44-9. 2009.
- Ennaceur, A. e K. Meliani. Effects of physostigmine and scopolamine on rats' performances in object-recognition and radial-maze tests. Psychopharmacology (Berl), v.109, n.3, p.321-30. 1992.

- Everitt, B. J. e T. W. Robbins. Central cholinergic systems and cognition. Annu Rev Psychol, v.48, p.649-84. 1997.
- Ferreira, G., R. Gervais, *et al.* Postacquisition scopolamine treatments reveal the time course for the formation of lamb odor recognition memory in parturient ewes. Behav Neurosci, v.113, n.1, Feb, p.136-42. 1999.
- Ferris, C. F., S. F. Lu, *et al.* Orally active vasopressin V1a receptor antagonist, SRX251, selectively blocks aggressive behavior. Pharmacol Biochem Behav, v.83, n.2, Feb, p.169-74. 2006.
- Fontana, D. J., S. E. Daniels, *et al.* Ondansetron improves cognitive performance in the Morris water maze spatial navigation task. Psychopharmacology (Berl), v.120, n.4, Aug, p.409-17. 1995.
- Frank, E. e R. Landgraf. The vasopressin system--from antidiuresis to psychopathology. Eur J Pharmacol, v.583, n.2-3, Apr 7, p.226-42. 2008.
- Gold, P. E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. Neurobiol Learn Mem, v.80, n.3, Nov, p.194-210. 2003.
- Gower, A. J. Enhancement by secoverine and physostigmine of retention of passive avoidance response in mice. Psychopharmacology (Berl), v.91, n.3, p.326-9. 1987.
- Halasz, J., Z. Liposits, *et al.* Neural background of glucocorticoid dysfunction-induced abnormal aggression in rats: involvement of fear- and stress-related structures. Eur J Neurosci, v.15, n.3, Feb, p.561-9. 2002.
- Han, J. S., J. L. Bizon, *et al.* Decreased glucocorticoid receptor mRNA and dysfunction of HPA axis in rats after removal of the cholinergic innervation to hippocampus. Eur J Neurosci, v.16, n.7, Oct, p.1399-404. 2002.
- Hasselmo, M. E. The role of acetylcholine in learning and memory. Curr Opin Neurobiol, v.16, n.6, Dec, p.710-5. 2006.
- Haxby, J. V., E. A. Hoffman, *et al.* Human neural systems for face recognition and social communication. Biol Psychiatry, v.51, n.1, Jan 1, p.59-67. 2002.
- Hernando, F., O. Schoots, *et al.* Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. Endocrinology, v.142, n.4, Apr, p.1659-68. 2001.
- Hunsaker, M. R., J. L. Rogers, *et al.* Behavioral characterization of a transection of dorsal CA3 subcortical efferents: comparison with scopolamine and physostigmine infusions into dorsal CA3. Neurobiol Learn Mem, v.88, n.1, Jul, p.127-36. 2007.
- Insel, T. R. The challenge of translation in social neuroscience: a review of oxytocin, vasopressin, and affiliative behavior. Neuron, v.65, n.6, Mar 25, p.768-79. 2010.
- Insel, T. R. e R. D. Fernald. How the brain processes social information: searching for the social brain. Annu Rev Neurosci, v.27, p.697-722. 2004.
- Izquierdo, L. A., D. M. Barros, *et al.* Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. Cell Mol Neurobiol, v.22, n.3, Jun, p.269-87. 2002.

- Keller, M., M. Meurisse, *et al.* Mapping of brain networks involved in consolidation of lamb recognition memory. Neuroscience, v.133, n.2, p.359-69. 2005.
- Kim, J. S. e E. D. Levin. Nicotinic, muscarinic and dopaminergic actions in the ventral hippocampus and the nucleus accumbens: effects on spatial working memory in rats. Brain Res, v.725, n.2, Jul 1, p.231-40. 1996.
- Klinkenberg, I., A. Sambeth, *et al.* Acetylcholine and attention. Behav Brain Res, v.221, n.2, Aug 10, p.430-42. 2011.
- Kogan, J. H., P. W. Frankland, *et al.* Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. Hippocampus, v.10, n.1, p.47-56. 2000.
- Kollack-Walker, S., S. J. Watson, *et al.* Social stress in hamsters: defeat activates specific neurocircuits within the brain. J Neurosci, v.17, n.22, Nov 15, p.8842-55. 1997.
- Kono, R., N. Tashiro, *et al.* Inhibitory effects of acetylcholine on aggressive-defense reaction induced by electrical stimulation of the hypothalamus in cats. Brain Res Bull, v.16, n.4, Apr, p.491-5. 1986.
- Kruk, M. R., K. G. Westphal, *et al.* The hypothalamus: cross-roads of endocrine and behavioural regulation in grooming and aggression. Neurosci Biobehav Rev, v.23, n.2, p.163-77. 1998.
- Lamprea, M. R., F. P. Cardenas, *et al.* Effects of septal cholinergic lesion on rat exploratory behavior in an open-field. Braz J Med Biol Res, v.36, n.2, Feb, p.233-8. 2003.
- Lauand, F., S. G. Ruginsk, *et al.* Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation. Neuroscience, v.147, n.1, Jun 15, p.247-57. 2007.
- Linster, C., P. A. Garcia, *et al.* Selective loss of cholinergic neurons projecting to the olfactory system increases perceptual generalization between similar, but not dissimilar, odorants. Behav Neurosci, v.115, n.4, Aug, p.826-33. 2001.
- Ludwig, M., T. Horn, *et al.* Osmotic stimulation of the supraoptic nucleus: central and peripheral vasopressin release and blood pressure. Am J Physiol, v.266, n.3 Pt 1, Mar, p.E351-6. 1994.
- Maestripieri, D., A. Badiani, *et al.* Prepartal chronic stress increases anxiety and decreases aggression in lactating female mice. Behav Neurosci, v.105, n.5, Oct, p.663-8. 1991.
- Mandairon, N., C. J. Ferretti, *et al.* Cholinergic modulation in the olfactory bulb influences spontaneous olfactory discrimination in adult rats. Eur J Neurosci, v.24, n.11, Dec, p.3234-44. 2006.
- Martinez, M., P. J. Phillips, *et al.* Adaptation in patterns of c-fos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. Eur J Neurosci, v.10, n.1, Jan, p.20-33. 1998.
- Mcgaugh, J. L. Time-dependent processes in memory storage. Science, v.153, n.742, Sep 16, p.1351-8. 1966.
- \_\_\_\_\_. Memory--a century of consolidation. Science, v.287, n.5451, Jan 14, p.248-51. 2000.
- Mendelowitz, D. Advances in Parasympathetic Control of Heart Rate and Cardiac Function. News Physiol Sci, v.14, Aug, p.155-161. 1999.

- Miczek, K. A., S. C. Maxson, *et al.* Aggressive behavioral phenotypes in mice. Behav Brain Res, v.125, n.1-2, Nov 1, p.167-81. 2001.
- Mishima, K., K. Iwasaki, *et al.* The scopolamine-induced impairment of spatial cognition parallels the acetylcholine release in the ventral hippocampus in rats. Jpn J Pharmacol, v.84, n.2, Oct, p.163-73. 2000.
- Nelson, R. J. e B. C. Trainor. Neural mechanisms of aggression. Nat Rev Neurosci, v.8, n.7, Jul, p.536-46. 2007.
- Nguyen, M. L., G. D. Cox, *et al.* Kinetic parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine. Biochemistry, v.37, n.38, Sep 22, p.13400-10. 1998.
- Ohno, M., E. A. Sametsky, *et al.* BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuron, v.41, n.1, Jan 8, p.27-33. 2004.
- Ostrowski, N. L., S. J. Lolait, *et al.* Cellular localization of vasopressin V1a receptor messenger ribonucleic acid in adult male rat brain, pineal, and brain vasculature. Endocrinology, v.135, n.4, Oct, p.1511-28. 1994.
- Paban, V., B. Soumireu-Mourat, *et al.* Behavioral effects of arginine8-vasopressin in the Hebb-Williams maze. Behav Brain Res, v.141, n.1, Apr 17, p.1-9. 2003.
- Pacak, K. e M. Palkovits. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. Endocr Rev, v.22, n.4, Aug, p.502-48. 2001.
- Petrulis, A. e H. Eichenbaum. The perirhinal-entorhinal cortex, but not the hippocampus, is critical for expression of individual recognition in the context of the Coolidge effect. Neuroscience, v.122, n.3, p.599-607. 2003.
- Power, A. E., A. Vazdarjanova, *et al.* Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. Neurobiol Learn Mem, v.80, n.3, Nov, p.178-93. 2003.
- Prado, V. F., C. Martins-Silva, *et al.* Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. Neuron, v.51, n.5, Sep 7, p.601-12. 2006.
- Puma, C., O. Deschaux, *et al.* Nicotine improves memory in an object recognition task in rats. Eur Neuropsychopharmacol, v.9, n.4, Jun, p.323-7. 1999.
- Rand, J. B. Acetylcholine. WormBook, p.1-21. 2007.
- Rhodes, M. E., S. M. O'toole, *et al.* Male-female differences in rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to nicotine stimulation. Brain Res Bull, v.54, n.6, Apr, p.681-8. 2001.
- Riedel, G., S. H. Kang, *et al.* Scopolamine-induced deficits in social memory in mice: reversal by donepezil. Behav Brain Res, v.204, n.1, Dec 1, p.217-25. 2009.
- Rogers, J. L. e R. P. Kesner. Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval of tone/shock-induced fear conditioning. Learn Mem, v.11, n.1, Jan-Feb, p.102-7. 2004.

- Rogers, R. C., G. E. Hermann, *et al.* Brainstem pathways responsible for oesophageal control of gastric motility and tone in the rat. J Physiol, v.514 ( Pt 2), Jan 15, p.369-83. 1999.
- Roghani, A., A. Shirzadi, *et al.* Differential distribution of the putative vesicular transporter for acetylcholine in the rat central nervous system. Brain Res Mol Brain Res, v.43, n.1-2, Dec 31, p.65-76. 1996.
- Ruff, R. L. Neurophysiology of the neuromuscular junction: overview. Ann N Y Acad Sci, v.998, Sep, p.1-10. 2003.
- Sanchez-Andrade, G., B. M. James, *et al.* Neural encoding of olfactory recognition memory. J Reprod Dev, v.51, n.5, Oct, p.547-58. 2005.
- Schafer, M. K., L. E. Eiden, *et al.* Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. I. Central nervous system. Neuroscience, v.84, n.2, May, p.331-59. 1998.
- Shen, E. e X. Sun. Endogenous acetylcholine-induced Fos expression in magnocellular neurosecretory neurons in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. Neurosci Lett, v.195, n.3, Aug 11, p.191-4. 1995.
- Sofroniew, M. V. Projections from vasopressin, oxytocin, and neurophysin neurons to neural targets in the rat and human. J Histochem Cytochem, v.28, n.5, May, p.475-8. 1980.
- Sofroniew, M. V., A. Weindl, *et al.* Immunohistochemistry of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the human and primate brain. Acta Histochem Suppl, v.24, p.79-95. 1981.
- Sokolowski, M. B. Social interactions in "simple" model systems. Neuron, v.65, n.6, Mar 25, p.780-94. 2010.
- Staubli, U., G. Ivy, *et al.* Hippocampal denervation causes rapid forgetting of olfactory information in rats. Proc Natl Acad Sci U S A, v.81, n.18, Sep, p.5885-7. 1984.
- Tanaka, K., Y. Osako, *et al.* Juvenile social experience regulates central neuropeptides relevant to emotional and social behaviors. Neuroscience, v.166, n.4, Apr 14, p.1036-42. 2010.
- Tang, Y., M. Mishkin, *et al.* Effects of muscarinic blockade in perirhinal cortex during visual recognition. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.23, Nov 11, p.12667-9. 1997.
- Thiel, C. M., J. P. Huston, *et al.* Hippocampal acetylcholine and habituation learning. Neuroscience, v.85, n.4, Aug, p.1253-62. 1998.
- Tobin, V. A., H. Hashimoto, *et al.* An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition. Nature, v.464, n.7287, Mar 18, p.413-7. 2010.
- Todeschin, A. S., E. C. Winkelmann-Duarte, *et al.* Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. Horm Behav, v.56, n.1, Jun, p.93-100. 2009.
- Turchi, J., R. C. Saunders, *et al.* Effects of cholinergic deafferentation of the rhinal cortex on visual recognition memory in monkeys. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.6, Feb 8, p.2158-61. 2005.

- Van Kampen, M., K. Selbach, *et al.* AR-R 17779 improves social recognition in rats by activation of nicotinic alpha7 receptors. Psychopharmacology (Berl), v.172, n.4, Apr, p.375-83. 2004.
- Van Wimersma Greidanus, T. B. e C. Maigret. The role of limbic vasopressin and oxytocin in social recognition. Brain Res, v.713, n.1-2, Mar 25, p.153-9. 1996.
- Veenema, A. H., D. I. Beiderbeck, *et al.* Distinct correlations of vasopressin release within the lateral septum and the bed nucleus of the stria terminalis with the display of intermale aggression. Horm Behav, v.58, n.2, Jul, p.273-81.
- Veenema, A. H., L. Torner, *et al.* Low inborn anxiety correlates with high intermale aggression: link to ACTH response and neuronal activation of the hypothalamic paraventricular nucleus. Horm Behav, v.51, n.1, Jan, p.11-9. 2007.
- Winslow, J. T. e F. Camacho. Cholinergic modulation of a decrement in social investigation following repeated contacts between mice. Psychopharmacology (Berl), v.121, n.2, Sep, p.164-72. 1995.
- Winters, B. D. e T. J. Bussey. Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat. Eur J Neurosci, v.21, n.8, Apr, p.2263-70. 2005.
- Yang, M. e J. N. Crawley. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. Curr Protoc Neurosci, v.Chapter 8, Jul, p.Unit 8 24. 2009.
- Yoshimura, H. e N. Ogawa. Pharmacological analysis of agonistic behavior between resident and intruder mice: effect of anticholinergic drugs. Jpn J Pharmacol, v.32, n.6, Dec, p.1111-6. 1982.
- Young, L. J. The neurobiology of social recognition, approach, and avoidance. Biol Psychiatry, v.51, n.1, Jan 1, p.18-26. 2002.
- Zaninetti, M., E. Tribollet, *et al.* Nicotinic cholinergic activation of magnocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. Neuroscience, v.110, n.2, p.287-99. 2002.
- Zarros, A., K. S. Kalopita, *et al.* Serotonergic impairment and aggressive behavior in Alzheimer's disease. Acta Neurobiol Exp (Wars), v.65, n.3, p.277-86. 2005.