

**Participação da amígdala medial  
póstero-dorsal no comportamento  
agressivo de ratos: expressão da  
proteína Fos e efeito da microinjeção  
de somatostatina**

Aluna: Daniela Haas

Orientador: Dr. Alberto Antonio Rasia Filho

Co-orientadora: Dra. Márcia Giovenardi

Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Mestre.

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Catálogo na Publicação

H112p Haas, Daniela  
Participação da amígdala medial pósterio-dorsal (MePD)  
no comportamento agressivo de ratos : expressão da  
proteína Fos e efeito da microinjeção de somatostatina  
/ Daniela Haas. – 2009.  
122 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de  
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-  
Graduação em Patologia, 2009.

“Orientador: Dr. Alberto Antonio Rasia Filho ; Co-  
orientadora: Dra. Márcia Giovenardi”.

1. Complexo amigdaliano. 2. Amígdala Medial  
Pósterio-Dorsal. 3. Comportamento agressivo. 4. Proteína  
Fos. I. Título

CDD 612.82  
CDU 612.821.3

**Participação da amígdala medial  
póstero-dorsal no comportamento  
agressivo de ratos: expressão da  
proteína Fos e efeito da microinjeção  
de somatostatina**

Aluna: Daniela Haas  
Orientador: Dr. Alberto Antonio Rasia Filho  
Co-orientadora: Dra. Márcia Giovenardi

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Mestre.

*Desde o inicial desejo de fazer o mestrado, até este presente momento, a concreta finalização, remetia-me aos meus queridos pais: os professores Roberto e Elsi Maria Haas, que além de serem meus pais também foram meus mestres em sala de aula, representando meus maiores pilares de devoção, admiração e amor. Dedico este trabalho também aos meus irmãos Cristiane, Henrique, Heloisa e Sérgio, aos meus amados sobrinhos Matheus e Antonio e ao meu namorado Fernando. Obrigada pelo apoio!*

*“A verdade escondida  
Os dedos em figa  
Mentiu, calou, mas depois falou.  
Verdade, prossiga”.*

*Bertolt Brecht  
Teatro Completo: A Vida de Galileu*

## Agradecimentos

Eu agradeço...

A Deus, por ser maior que tudo e que todos!

À minha família, pelo apoio, paciência, amor, dedicação e compreensão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto Antonio Rasia Filho, pela sua inteligência e generosidade dispendidas para comigo durante esses anos de pesquisa.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Márcia Giovenardi que, com sua inteligência e perspicácia, norteou meus períodos de aflição e inexperiência. Por ter me proporcionado não só o convívio acadêmico, mas dedicando forte atenção de amizade e carinho.

Aos meus colegas de laboratório: Edson Quagliotto, Carolina Böttge Rosa, Alexandre Paim de Oliveira, Elisa Brosina de Leon, Ramiro Barcos Nunes, Deise Mota Pacheco, Vítor Scotta Hentschke, Rodrigo Boemo Jaenisch, Ananda Rucatti, Jadson Pereira Alves, Aline Dall'Oglio, Michele Arpini, Márcia Scherem de Azevedo, por prestarem solidariedade nos momentos difíceis e companheirismo nos momentos mais tranquilos.

Aos alunos de iniciação científica: Nathalie L. F. Sandi, Gabriel Natan Souza Pires e Franklin Panato Back, pela amizade, dedicação e empenho para o sucesso deste trabalho.

Ao estimado Prof. Dr. Pedro Dall'Ago, pelo carinho, atenção e serenidade com que sempre me acolheu.

À minha amiga de infância Caroline Perinazzo da Veiga, pela generosidade em ensinar-me os procedimentos da cirurgia estereotáxica.

Ao Mário, bioterista da UFCSPA, por ter tido paciência e agilidade quando, subitamente, eu o encontrava pelos corredores da instituição necessitando de mais ratos!

À Rosalva Thereza Meurer e Terezinha Stein, técnicas do Laboratório de Pesquisa em Patologia da Pós-Graduação da UFCSPA, pela disposição e carinho que sempre tiveram comigo e ao andamento da pesquisa.

À Técnica do Laboratório de Fisiologia, Carmem Rocha, por sua valiosa colaboração, carinho e dedicação que vão além do excelente apoio técnico.

À Secretaria de Pós-Graduação da UFCSPA, em especial à Ivonice Oliveira Santos, Maristela Pasin e Luciani Spencer, pelo auxílio, carinho, atenção e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia e seus professores, pela oportunidade e ensinamentos.

Aos funcionários da UFCSPA: Débora, Jaqueline, Djanine, Edi, Alexandre Masliniewsky, Alcântara e Paulo Zanchin.

Pelas verdadeiras amizades começadas nas inter-relações entre os PPGs, especialmente à Grazielle Halmenschlager e Juliana Kliemann.

À Profa. Dra. Matilde Achaval, pela colaboração no empréstimo do vibrátomo do laboratório de Histofisiologia Comparada da UFRGS.

Ao meu querido primo Prof. Dr. Egon Roque Frohlich, por incitar-me o respeito e admiração pela área acadêmica. Obrigada pelo contínuo apoio profissional!

Ao Gilberto, do Núcleo de Assistência à Estatística da UFRGS, pelo apoio na análise dos dados.

À CAPES e PIBIC-PIC pelas bolsas e financiamento para execução deste trabalho.



**SUMÁRIO**

<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>VII</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>1. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>11</b>
<b>1.1 AMÍGDALA</b>	<b>11</b>
<b>1.2 AMÍGDALA MEDIAL</b>	<b>14</b>
<b>1.3 AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-DORSAL</b>	<b>19</b>
<b>1.4 COMPORTAMENTO AGRESSIVO</b>	<b>21</b>
<b>1.5 CIRCUITOS NEURAI PARA O COMPORTAMENTO AGRESSIVO E INDÍCIOS DA PARTICIPAÇÃO NEUROMODULADORA DA AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-DORSAL</b>	<b>26</b>
<b>1.6 MODELOS DE ESTUDO DO COMPORTAMENTO AGRESSIVO</b>	<b>31</b>
<b>1.7 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FOS</b>	<b>35</b>
<b>1.8 SOMATOSTATINA</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>41</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>55</b>
<b>ARTIGO EM INGLÊS</b>	<b>56</b>
<b>ARTIGO EM PORTUGUÊS</b>	<b>88</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>122</b>
<b>ANEXOS</b>	

**Lista de Abreviaturas**

ABL	Amígdala Basolateral
ACe	Amígdala Central
ACO	Amígdala Cortical
ADI	Área de Interesse
AHA	Área Hipotalâmica de Ataque
AHI	Área Hipotalâmica Intermediária
AL	Amígdala Lateral
a.m.	<i>Ante Meridian</i>
AMe	Amígdala Medial
AOB	Bulbo Olfatório Acessório
AOI	<i>Area of Interest</i>
AP-1	Ativador da Proteína 1
BNST	Núcleo Próprio da Estria Terminal
<i>c-fos</i>	Nomenclatura do Gene Fos
<i>c-jun</i>	Nomenclatura do Gene Jun
<i>c-myc</i>	Nomenclatura do Gene Myc
CRH <i>receptor</i>	Receptor do Hormônio Liberador de Corticotropinas
DE	Dia Experimental
DPX	<i>Distyrene/Plasticizer/Xylene</i>
ED	<i>Experimental Day</i>
Fos-ir	Imunorreatividade à Proteína Fos
GC <i>receptor</i>	Receptor para Glicocorticóide
HPA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IgG	Imunoglobulina G

i.p.	Intra Peritoneal
LAL	Longa Latência de Ataque
LSD	<i>Least Significant Difference</i>
MeAD	Amígdala Medial Ântero-Dorsal
MeAV	Amígdala Medial Ântero-Ventral
MePD	Amígdala Medial Póster-Dorsal
MePV	Amígdala Medial Póster-Ventral
NST	Núcleo do Trato Solitário
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
p.m.	<i>Post Meridian</i>
PVN	Núcleo Paraventricular
SAL	Curta Latência de Ataque
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SRIFs	Fator de Inibição da Liberação de Somatotropinas
ST	Estria Terminal
TO	Trato Óptico
VMH	Núcleo Ventromedial do Hipotálamo

## INTRODUÇÃO

A amígdala não é uma unidade anatômica ou funcional (Swanson e Petrovich, 1998). Diversas são as subdivisões segundo sua citoarquitetura, hodologia e funcionalidade. O núcleo medial do complexo amigdaliano, denominado igualmente de amígdala medial (AMe), também é dividido em subnúcleos, e é o subnúcleo pósterodorsal (MePD) que será abordado na presente dissertação de mestrado.

Há vários estudos apontando a participação neuromoduladora da MePD no comportamento agressivo (Kollack-Walker e Newman, 1995; Veening *et al.*, 2005; Delville *et al.*, 2000; Swanson, 2000). Para tanto, com base em vários modelos atualmente utilizados para estudar o comportamento agressivo de animais em laboratório, foi desenvolvido um protocolo para incitar a agressão em ratos machos adultos da cepa *Wistar*, conhecidos como ratos pouco agressivos em condição padrão de biotério (Albonetti e Farabollini, 1994; Veening *et al.*, 2005). Este protocolo seguiu procedimentos em que ratos ficaram isolados em suas caixas-“residências” por 14 dias e, nos dias de teste, foram submetidos a contenção manual por 1 minuto, quando, logo após, um rato intruso era colocado em contato no mesmo ambiente de criação do rato residente. Este iniciava uma série de comportamentos agressivos ofensivos contra o intruso a fim de defender seu território.

Para elucidar a participação da MePD na organização do comportamento agressivo e neste protocolo experimental, foi realizada a técnica de imunohistoquímica para identificar a expressão da proteína Fos nesta região em particular.

Em virtude de que alguns resultados não se mostraram conclusivos quanto ao objetivo inicial, um experimento adicional foi realizado e a somatostatina, neuropeptídeo com ação inibitória (Meis *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2002; Boehm e Betz, 1997; Delfs e Dichter, 1983), foi microinjetado unilateralmente na MePD de ratos e sob o mesmo protocolo experimental para estudo do comportamento agressivo.

Frente às várias e complexas ações da MePD como moduladora da gênese e do controle de comportamentos sociais, serão detalhados, a seguir, as particularidades anatômicas e fisiológicas da MePD; os protocolos atualmente em uso para indução da agressividade em ratos estudados em laboratório; a imunodeteção da proteína Fos; e, os efeitos da somatostatina microinjetada na MePD no o comportamento agressivo de ratos.

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 AMÍGDALA

Como revisado recentemente por Quagliotto (2006) e Rosa (2008), a amígdala, ou complexo amigdaliano<sup>1</sup>, constitui-se de núcleos subcorticais que se situam no lobo temporal, lateral ao hipotálamo e ventral ao estriado, no encéfalo de mamíferos. Em ratos, é caracterizada como uma massa ovóide de substância cinzenta, localizada ventral e rostralmente à formação hipocampal, tendo como limite posterior o corno temporal do ventrículo lateral (Alheid *et al.*, 1995; de Olmos e Heimer, 1999). O complexo amigdaliano é composto por núcleos e subnúcleos que formam uma intrincada rede estrutural e multifuncional, uma vez que está envolvida na modulação de diversos comportamentos e ajustes simpáticos e parassimpáticos (Alheid *et al.*, 1995; Everitt, 1995; Paxinos e Watson, 1998; Swanson e Petrovich, 1998; Rasia-Filho *et al.*, 2000).

O modelo atual de estudo da organização do complexo amigdaliano sugere que ele seja definido como um conjunto heterogêneo de grupos celulares nos hemisférios cerebrais (Swanson e Petrovich, 1998). Em recente classificação do complexo amigdaliano de ratos, Alheid e colaboradores (1995) e de Olmos e colaboradores (2004) apresentam-no dividido em quatro regiões, segundo a sua citoarquitetura, hodologia e funcionalidade que são: 1) amígdala “expandida”,

---

1. A terminologia anatômica nomeia esta estrutura como “corpo amigdalóide” na parte basilar do telencéfalo. Por definição encontrada em dicionário da língua portuguesa, “amigdaliano” é algo relativo ou pertencente à amígdala, enquanto “amigdalóide” é semelhante à amígdala. Com isso, “amigdalóide” representaria um termo não elucidativo da estrutura em questão ou tautológico. “Amigdaliano” poderia se referir à origem do termo “amígdala”, semelhante à amêndoa, conforme descrições originais e será utilizado nesta dissertação preferentemente (Rasia-Filho e Hilbig, 2005).

que subdivide-se em amígdala central (ACe) e amígdala medial (AMe); 2) amígdala com características corticais (amígdala cortical - ACO), que subdivide-se em porções relacionadas com as vias olfativa e vomeronasal e, ainda, com a região basolateral; 3) regiões de transição, situadas entre a porção ventral do estriado e a amígdala “expandida”; e, 4) núcleos ainda não classificados.

Ainda neste sentido, a classificação acima descrita foi corroborada por de Olmos e colaboradores (2004) que consideram a AMe e a ACe como pertencentes à “amígdala expandida”, pois ambos os núcleos parecem ter estruturas homólogas, que avançam os limites anatômicos do complexo amigdaliano.

Mais recentemente Knapska e colaboradores (2007) sugeriram que o complexo amigdaliano de ratos permite a distinção de três grandes regiões, de acordo com critérios citoarquitetônicos, quimioarquitetônicos e de suas conexões, a saber: 1) amígdala basolateral (ABL), que é constituída por uma extensão ventromedial da camada mais profunda do córtex cerebral (núcleos lateral, basal e basolateral); 2) amígdala centromedial, que é uma extensão ventromedial especializada do estriado (sendo dividida em ACe e AMe, assim como da parte amigdaliana do núcleo próprio da estria terminal - BNST -); e, 3) amígdala com características corticais, que é subdividida em porções relacionadas com as vias olfativa e vomeronasal.

Qualquer que seja o modelo de estudo da organização do complexo amigdaliano, o fato é que ela não é homogênea em termos estruturais ou funcionais, mas sim, definida como um conjunto heterogêneo de grupos celulares que, originalmente, foram considerados como sendo de uma mesma estrutura devido a sua proximidade anatômica (Swanson e Petrovich, 1998).

Atribui-se aos diversos núcleos do complexo amigdaliano de ratos funções como: respostas a estímulos gerados por medo e ansiedade; percepções de estímulos olfativos e hormonais; modulação do comportamento reprodutivo; e, participação na aquisição do aprendizado e da memória condicionada (Rasia-Filho *et al.*, 1991; Kling e Brothers, 1992; LeDoux, 1982; Everitt, 1995; Kondo e Arai, 1995; Wood e Newman, 1995; Quirk *et al.*, 1995; Guillamón e Segovia, 1997; Swanson e Petrovich, 1998; Davis, 2000; Pitkänen, 2000).

Para tanto, tais subnúcleos possuem a capacidade de receber diferentes informações sensoriais, tanto interoceptivas quanto exteroceptivas (estímulos olfativos, auditivos e visuais), que acabam por modificar sua atividade e estimular diversas regiões do sistema nervoso central (SNC), em resposta ao estímulo inicial (Kling e Brothers, 1992; LeDoux, 1982; Quirk *et al.*, 1995; Davis, 2000). Desta forma, os núcleos amigdalianos apresentam a capacidade de adequar a relação do animal com seu ambiente, modulando o comportamento social e conjugando-o com alterações simpáticas/parassimpáticas e neuroendócrinas.

Para o que interessa esta dissertação de mestrado, experimentos envolvendo a estimulação elétrica ou lesões na estrutura geral amigdaliana afetam uma variedade de respostas viscerais mediadas por controle do Sistema Nervoso (SN) (Rasia-Filho, 2006) e comportamentos emocionais (Bear *et al.*, 2002). Esses efeitos são, frequentemente, similares àqueles associados com a estimulação ou lesão na região lateral ou medial do hipotálamo (Canteras, 2003). Notavelmente, vários núcleos amigdalianos estão reciprocamente conectados com áreas do hipotálamo, formação hipocampal, neocórtex, tálamo e substância cinzenta periaquedutal (PAG) dorsal (Canteras *et al.*, 1995). Quando a ACe é ativada, a resposta ao estresse é emitida (Bear *et al.*, 2002). A PAG dorsal, estando



conectada ao complexo amigdaliano e ao hipotálamo medial, é responsável pela expressão dos comportamentos aversivos e defensivos (Matheus *et al.*, 1997). É interessante que a AMe é quem, preferentemente, gera respostas a estímulos estressantes, mais do que a ACe (Dayas *et al.*, 1999).

## 1.2 AMÍGDALA MEDIAL

A AMe, é um dos núcleos do complexo amigdaliano, ocupando sua região rostromedial (Alheid *et al.*, 1995). É formada por uma coluna proeminente de células que surgem em justaposição à superfície lateral de fibras que ascendem pelo trato óptico (TO) (Alheid *et al.*, 1995). Inicia medial e posteriormente ao núcleo do trato olfatório, estendendo-se caudalmente até o surgimento do corno temporal do ventrículo lateral. Nesse nível, ela situa-se dorsomedialmente ao pólo cefálico da área de transição amígdalo-hipocampal, formando a região medial da parede anterior dessa posição do ventrículo. Ao longo de toda sua extensão, a AMe encontra-se lateralmente em íntimo contato com a região ventro-lateral do TO. Seu limite rostral com a amígdala anterior e lateral as camadas profundas do núcleo cortical anterior não estão claramente definidos (Alheid e Heimer, 1988; Alheid *et al.*, 1995; Pitkänen, 2000).

Diante de diferenças morfológicas e funcionais da AMe, Alheid e colaboradores (1995) e Paxinos e Watson (1998), dividiram-na em amígdala medial ântero-dorsal (MeAD); amígdala medial ântero-ventral (MeAV); amígdala medial pósterodorsal (MePD) e amígdala medial póstero-ventral (MePV) (FIGURA 1). Em função de suas conexões, ela pode ser organizada em uma

região rostral ou anterior, da qual fazem parte a MeAD, a MeAV e a MePV, e uma região caudal ou posterior, constituída pela MePD (Canteras *et al.*, 1995), embora isso seja absolutamente contestável frente a várias outras evidências experimentais (Dall'Oglio *et al.*, 2008).

Funcionalmente, a AMe é descrita como uma região moduladora da memória condicionada e do aprendizado, onde o componente emocional está envolvido (Allen e Allen, 1974; Aggleton e Blindt, 1989; Shindou *et al.*, 1993; Canteras *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1995; Roozendaal e McGaugh, 1996; McGaugh, 1992; Rasia-Filho *et al.*, 2000). Isso foi observado em testes de esquivas inibitória (Roozendaal e McGaugh, 1996; McGaugh, 1992), nas respostas neuroendócrinas a um evento estressor (McGaugh, 1992; Lu *et al.*, 1995; Dayas *et al.*, 1999) e em uma série de testes de comportamentos sociais, tais como o agressivo (Sloddart-Apter e MacDonnel, 1980; Vochteloo e Koolhaas, 1987; Siegel e Brutus, 1990; Hines *et al.*, 1992; Dielenberg *et al.*, 2001), defensivo (Shaikh *et al.*, 1993; Bolhuis *et al.*, 1984), sexual (Rasia-Filho *et al.*, 1991; Kondo, 1992; Wong *et al.*, 1993; Meisel e Sachs, 1994; Kondo e Arai, 1995; Newman, 1999; Dominguez e Hull, 2001) e maternal (Numan *et al.*, 1993; Morgan *et al.*, 1999; Sheehan *et al.*, 2000).

Resultados mais recentes e achados hodológicos funcionais não permitem considerar a MeAD e a MePV como sendo componentes de uma única região “ventral” (Dall'Oglio *et al.*, 2008). Wood e Newman (1995) propuseram que a região anterior da AMe estaria principalmente sendo influenciada por informações olfatórias, e a região posterior, pelos hormônios gonadais. Essa divisão anátomo-funcional não é absolutamente restritiva, porque há receptores para esteróides sexuais e conexões sinápticas recíprocas em todas as regiões da AMe (Lehman e

Winans, 1982; Österlund *et al.*, 1998; Newman, 2002; Simerly, 2004). Não obstante, as regiões anterior e posterior da AMe devem ser estudadas separadamente, a fim de que particularidades, tanto morfológicas, quanto

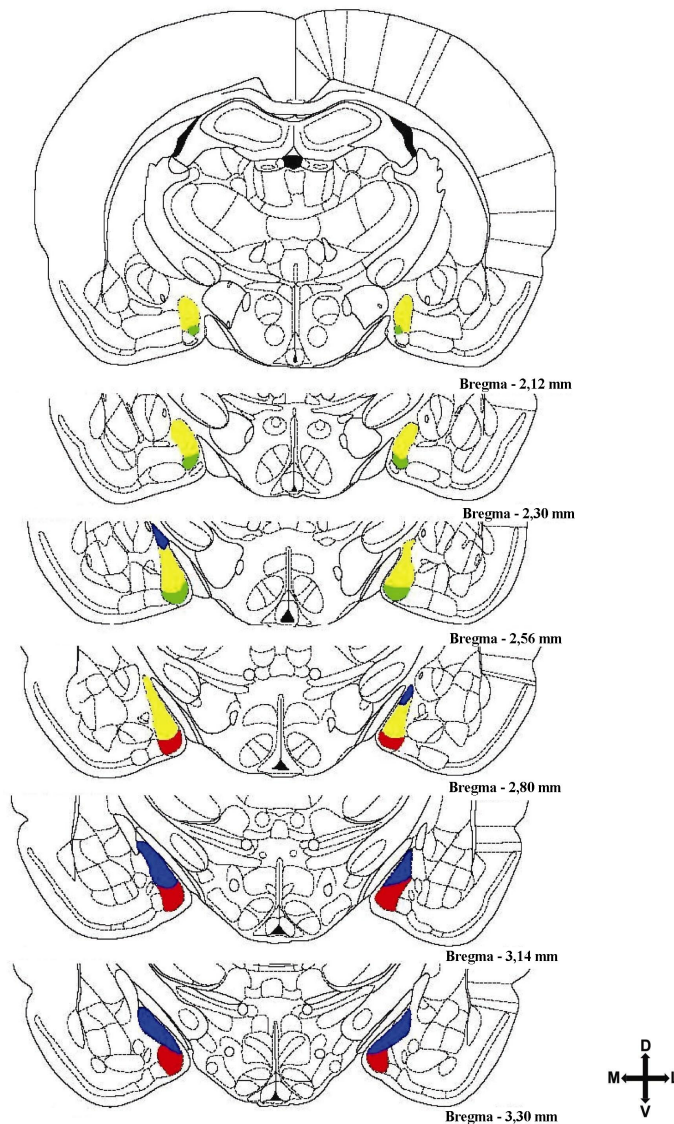


FIGURA 1 Representação esquemática de cortes coronais do encéfalo do rato onde pode-se observar os quatro subnúcleos da amígdala medial, a saber: ântero dorsal (MeAD, em amarelo), ântero-ventral (MeAV, em verde), póstero-dorsal (MePD, em azul) e póstero-ventral (MePV, em vermelho). Os valores em mm colocados no lado direito das imagens referem-se às distâncias posteriores ao bregma. As coordenadas espaciais referem-se ao hemisfério direito e são dorsal (D), ventral (V), medial (M) e lateral (L). Figuras e abreviaturas baseadas no atlas do encéfalo do rato de Paxinos e Watson (1998), reproduzido com autorização de Quagliotto (2006) e Rosa (2008).

funcionais dos subnúcleos, em ambas as porções possam ser melhor esclarecidas. Isto é, ao contrário de identificar propriedades únicas para uma mesma estrutura heterogênea, como é a AMe, com esse maior detalhamento é possível que diferenças sutis entre seus subnúcleos possam ser encontradas (Lehman e Winans, 1982; Newman, 2002; Maren, 1996; Österlund *et al.*, 1998; Rasia-Filho *et al.*, 1999, 2002, 2004; Simerly, 2004; Dall'Oglio *et al.*, 2008).

A maioria das aferências neuronais aos subnúcleos da AMe são provenientes diretamente do bulbo olfatório acessório (AOB), que envolve estímulos de ferômonios que atuam no órgão vomeronasal (Ottersen, 1980; Pitkänen, 2000; Westberry, 2003). Basicamente, as demais aferências são provenientes do córtex cerebral pré-frontal, BNST e de vários núcleos do hipotálamo, algumas claramente recíprocas, envolvidas com a modulação da atividade neuroendócrina e da emissão de vários comportamentos sociais (McDonald, 1998; Petrovich *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2001). Há, também, aferências mais modestas de regiões do telencéfalo basal, e de núcleos do tálamo, da região dorsal da ponte, relacionada com informações somáticas e viscerais, de grupos celulares da rafe mesencefálica e do locus ceruleus (Jones e Moore, 1977; Azmitia e Segal, 1978; Ottersen, 1980; Groove, 1988; Herbert e Saper, 1990; McDonald, 1998; Pitkänen, 2000; Knapska *et al.*, 2007) (FIGURA 2).

Estudos em ratos indicam que os subnúcleos da AMe projetam-se para núcleos hipotalâmicos envolvidos com diversos comportamentos por via direta ou, indiretamente, via hipocampo ventral que, por sua vez, projeta eferências para o hipotálamo medial (Petrovich *et al.*, 2001). Com isso, a AMe pode modular respostas a estímulos estressantes que são seguidas por respostas neuroendócrinas

de ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e, ao mesmo tempo com a ação das catecolaminas circulantes e com a corticosterona, alterando o funcionamento do complexo amigdaliano. A presença das catecolaminas liberadas pela adrenal na circulação sanguínea é percebida por terminações vagais que

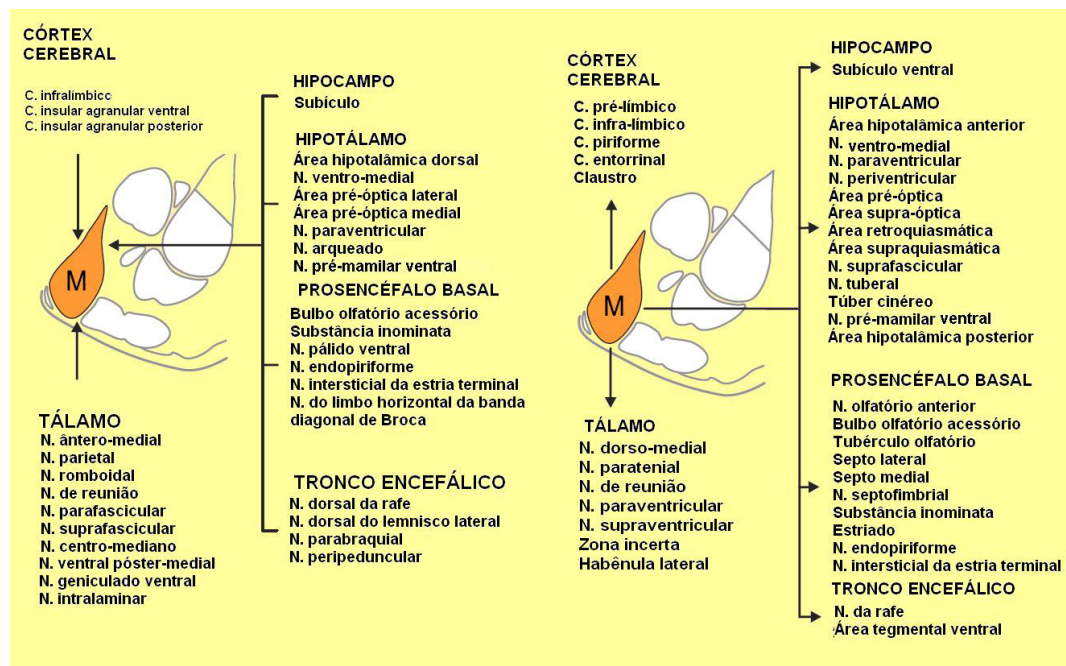


FIGURA 2 Conexões aferentes (à esquerda) e eferentes (à direita) demonstradas de forma geral para os componentes do núcleo medial da amígdala de ratos. Figura modificada de Knapska e colaboradores (2007).

atingem o núcleo do trato solitário (NTS) e, deste chega, ao complexo amigdaliano (McGaugh *et al.*, 1996). Isto modifica a ação da AMe e da ABL na consolidação de memórias condicionadas conjugando, em paralelo, atividades inatas e aprendidas (Allen e Allen., 1974; Bennett *et al.*, 1985; McGaugh, 1992; Canteras *et al.*, 1995; Roozendaal e McGaugh, 1996). Isto foi notavelmente observado em situações emocionais como a exposição do animal ao seu predador natural (Kling e Brothers, 1992; McGaugh *et al.*, 1992; Roozendaal e McGaugh,

1996). É interessante que, em ratos, a lesão da ACe, da AMe e do ACO aumentou a investigação social em seus próprios predadores (Blanchard e Blanchard, 1972) e gerou uma perda total da retenção da informação necessária para a adaptação comportamental relacionada com a dominação social (Bolhuis *et al.*, 1984).

### 1.3 AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-DORSAL

Podemos caracterizar a MePD como uma região de células densamente agrupadas medialmente, as quais se estendem superficial e profundamente, sendo separadas por uma região intermediária de células esparsas e, relativamente distantes de uma terceira coluna de células orientadas paralelamente e mais lateralmente, estas já no limite provável deste subnúcleo (Alheid *et al.*, 1995; de Olmos *et al.*, 2004). Ela está situada de forma adjacente ao TO e ventral à estria terminal (ST), na parte do telencéfalo ventral (FIGURA 3), e em cortes histológicos coronais corados pela técnica de Nissl, aparece com a forma de um triângulo alongado, com uma base ventral que se estende no terço caudal da AMe (Alheid *et al.*, 1995; de Olmos *et al.*, 2004).

Os principais neuropeptídeos encontrados na MePD de ratos são: substância P, colecistocinina, vasopressina, somatostatina, ocitocina, neuropeptídeo Y, opióides, angiotensina II, galanina, hormônio liberador de corticotropina e hormônio liberador de gonadotrofinas (Frankfurt *et al.*, 1985; Micevych *et al.*, 1988; De Vries, 1995; Veinante e Freund-Mercier, 1997; Wilson *et al.*, 2002; Gloor, 1997; de Olmos *et al.*, 2004). As funções integrativas fisiológicas para todos estes neurotransmissores na MePD ainda não estão claras.

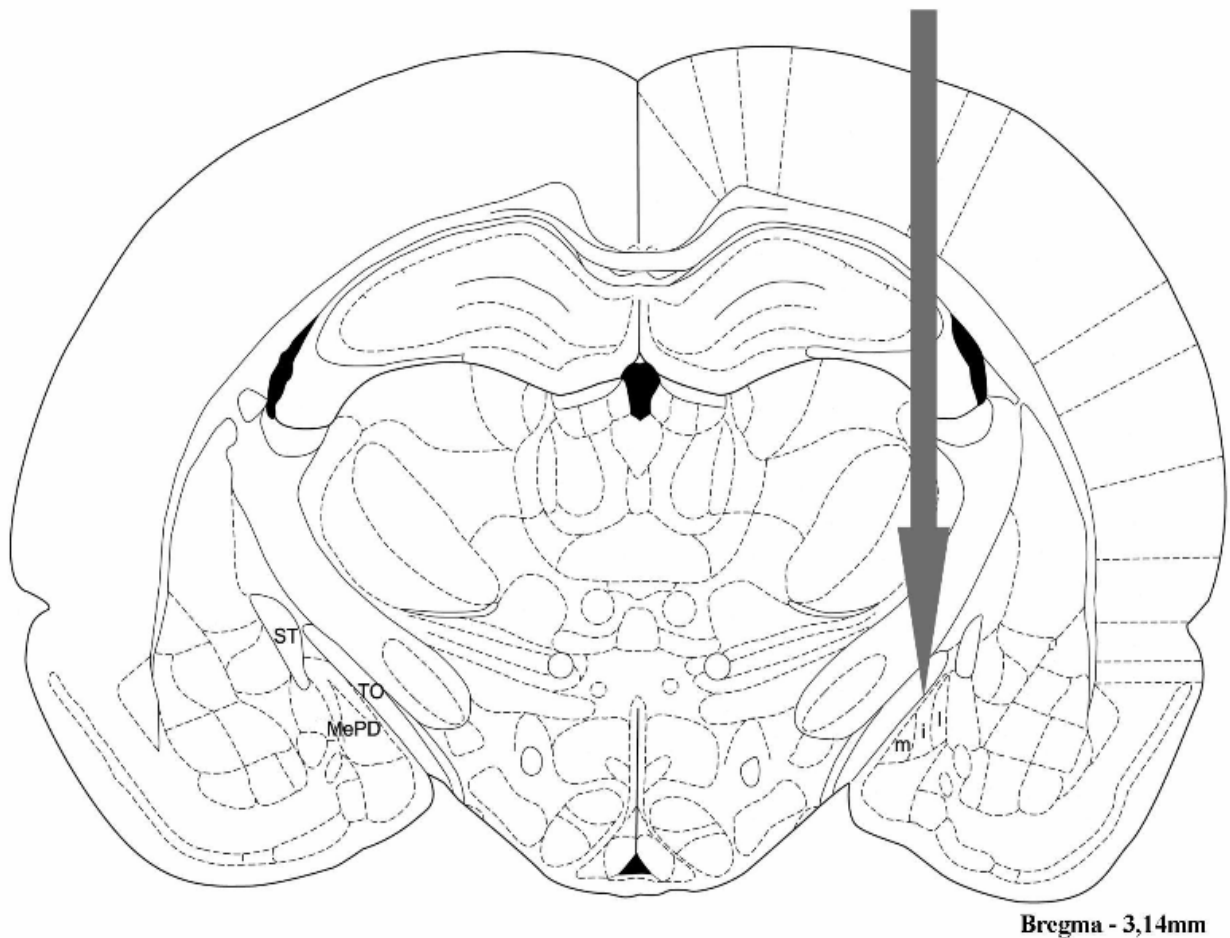


FIGURA 3 Esquema representativo de corte coronal do encéfalo do rato, 3,14 mm posterior à sutura bregmática, onde se observa a íntima relação existente entre a amígdala medial pótero-dorsal (MePD), o trato óptico (TO) e a estria terminal (ST), demonstrando sua localização, e suas camadas celulares medial (m), intermediária (i) e lateral (l). Figura modificada de Paxinos e Watson (1998), reproduzido com autorização de Quagliotto (2006) e Rosa (2008).

A maioria dos axônios de projeção extra-amigdalóide deixa a AMe via ST ou pela “ansa peduncularis” (via amígdalo-fugal) indo, a seguir, em direção a regiões telencefálicas ou diencefálicas. A MeAD e a MePV utilizam como via principal a “ansa peduncularis”, enquanto a MePD utiliza-se da ST como via eferente preponderante (Swanson e Cowan, 1979; Bennett *et al.*, 1985; de Olmos

*et al.*, 2004). Visto de uma forma geral, grupos celulares da divisão posterior da BNST são topograficamente organizadas, mantendo conexões bidirecionais com a AMe e outros núcleos amigdalianos, compondo, desta forma, o sistema olfatório acessório (Dong e Swanson, 2006).

A parte celular da MePD tem, em seu contorno medial, uma “camada molecular” constituída de poucas células e que se estreita dorsalmente e rostralmente até desaparecer por completo na MeAD (de Olmos *et al.*, 2004). Esta dita “camada molecular” corresponde, na verdade, ao feixe de axônios que formam a via eferente do núcleo próprio da via olfatória acessória (de Olmos *et al.*, 2004) e que, de forma pouco justificável, foi incluída como constituinte da MePD em estudo recente (Guirado *et al.*, 2008).

Usunoff e colaboradores (2009), por meio de rastreamento axonal anterógrado usando aminodextrana biotinilada, mapearam, em camundongos, as vias de projeções da MePD. A via eferente de maior conexão foi para a BNST, na qual todas as partes da sua divisão medial foram inervadas por neurônios oriundos da MePD. Substanciais projeções alcançaram o hipotálamo anterior e o *tuber cinereum*, enquanto que, conexões com o hipotálamo lateral, se mostraram de forma generalizada, porém com densidade moderada.

#### **1.4 COMPORTAMENTO AGRESSIVO**

Dentro de uma perspectiva ampla, o comportamento agressivo é considerado como uma atitude social que implica em lesões ou em ameaças aos indivíduos (Berkowitz, 1983). Trata-se de um componente normal do repertório



comportamental de mamíferos (Adams, 2006), sendo classificado como comportamento social, abrangendo respostas viscerais e motoras. A agressividade do animal está relacionada a uma ameaça potencial ou real, podendo ter ou não a intenção de causar dano ao oponente (Timo-Iaria, 1988; Adams, 2006; Nelson e Trainor, 2007). Tais comportamentos têm como objetivo a proteção ou disputa de território, defesa da prole, obtenção de comida para a sua sobrevivência, reprodução ou até mesmo a intenção de intimidar um adversário em potencial (Nelson e Trainor, 2007; David *et al.*, 2004).

O comportamento agressivo é observado em diversas espécies animais. Os ratos são animais que vivem socialmente e defendem seu território (Blanchard *et al.*, 1984). Tal comportamento territorial pode ser demonstrado em ambientes seminaturais de laboratório, usando variedades domesticadas de roedores (Blanchard *et al.*, 1984; Lucion e de Almeida, 1991). A introdução de um animal estranho no território de uma colônia estabelecida (Flannelly e Flannelly, 1987; Lucion e de Almeida, 1991), evoca comportamentos por parte de um rato macho residente, em direção ao intruso, similar ao que ocorre em circunstâncias naturais (Olivier *et al.*, 1989a; Olivier *et al.*, 1989b).

Em 1980, Delgado já preconizava que o comportamento agressivo é caracterizado pela impulsividade e pela violência, sendo modulado por circuitos neurais que integram informações sensoriais oriundas do ambiente. Esses circuitos neurais estão sujeitos a modificações, isto é, apresentam plasticidade, podendo ser influenciados por experiências vivenciadas, bem como, fatores ambientais e hormonais individuais. Esses fatores influenciam a probabilidade e a intensidade de um encontro agonístico (Ferris *et al.*, 2008).

A MePD é influenciada por informações vomeronasais provenientes do AOB que chegam, primeiramente, na MeAD (Bressler e Baum, 1996; Guillamón e Segovia, 1997; McDonald, 1998; Meredith e Westberry, 2004). A MeAD, por sua vez, reconhece a relevância social do estímulo olfativo e, via núcleos intercalados amigdalianos, determina se ela será estimulada ou não (Meredith e Westberry, 2004). Essa aferência à MePD envolve um componente direto, que é excitatório, e interneurônios locais inibitórios (Bian *et al.*, 2008) que, a seguir, ativam vias de projeção a núcleos hipotalâmicos igualmente excitatórias ou inibitórias (Carrer *et al.*, 1978; Bian *et al.*, 2008).

Embora estas categorias de agressões apresentem-se expressas em praticamente todas as espécies de mamíferos, a grande maioria de trabalhos sobre funções endócrinas em agressão envolve três espécies de roedores, a saber: ratos (*Rattus norvegicus*), camundongos (*Mus musculus domesticus*) e hamsters (*Mesocricetus auratus*) (Blanchard *et al.*, 2003). Baseados em pesquisas com roedores, discorreremos sobre tópicos relevantes desses animais e de seus comportamentos agressivos.

A fim de distinguir comportamentos de roedores machos e fêmeas, é importante destacar que fêmeas apresentam comportamento agressivo em um período específico da vida, isto é, no período pós-parto seguido de duas semanas, ao contrário dos machos, que podem manifestar este tipo de comportamento de maneira contínua ao longo da vida (Grotta e Ader, 1974; Giovenardi *et al.*, 1998; Giovenardi *et al.*, 2005; de Almeida e Lucion, 1997; Miczek *et al.*, 2007).

O comportamento agressivo, sendo um comportamento instintivo e essencial em diversas espécies, é classificado em duas categorias: agressividade predatória e agressividade afetiva (Moyer, 1968). A agressão predatória envolve

o ataque contra um membro de uma espécie diferente, com o propósito de obter alimento, e não está associada com a atividade simpática. Já a agressão afetiva, tem como objetivo a demonstração de dominação quando, então, o animal emite vocalizações e ao mesmo tempo adota posturas típicas, neste caso envolvendo alta atividade simpática (Bear *et al.*, 2002). A agressividade afetiva pode ser dividida em defensiva e ofensiva.

A agressividade defensiva, por ser potencializada pelo medo e/ou pela dor, é amplamente independente da testosterona e é governada por mecanismos cerebrais separados (Blanchard e Blanchard, 1984; Albert *et al.*, 1993). Ela é estabelecida com o intento de defender sua integridade corporal, tanto em caso de agressão contra animais co-específicos, quanto contra predadores (Blanchard *et al.*, 2003; Rasia-Filho *et al.*, 2008). Esta forma de comportamento agressivo, originalmente descrito como “*affektive abwehr*” (defesa afetiva) por Hess e Brugger em 1943, é caracterizado por notáveis sinais, como a piloereção; retração das orelhas; arqueamento de dorso e dilatação pupilar. Em ratos, podemos citar diversas áreas envolvidas com este comportamento, como área hipotalâmica intermediária (núcleo hipotalâmico ventromedial), MePV, córtex pré-frontal, área septal, núcleo talâmico médio-dorsal, tegmento ventral e PAG (Siegel, 1991).

Por sua vez, a agressão ofensiva envolve respostas a desafios por recursos. Este tipo de agressão envolve respostas adaptativas ou de domínio, seja ele territorial ou reprodutivo (Blanchard *et al.*, 2003).

É indispensável discriminar o comportamento agressivo ofensivo de um outro tipo comportamental denominado “*play fighting*” ou “jogos de luta”. Esse é distinguido como um padrão de comportamento apresentado por animais sexualmente imaturos, no período pré-púbere, no qual não se observa relação de

hierarquia ou dominância. Tal categoria comportamental, embora não envolva mordida e se dê em contexto amigável, parece estar ligada a padrões de subordinação e dominância social na vida adulta (Blanchard *et al.*, 2003).

Há diferenças nas ações de agressividade ofensiva e defensiva, principalmente quanto ao contexto em que estão inseridas e quanto aos alvos de ataque (Haller e Kruk, 2006a). Durante o confronto entre ratos, o comportamento agressivo ofensivo tem como alvo a parte dorsal e lateral do oponente, ao passo que no comportamento defensivo, o ataque é direcionado para o focinho do oponente ou predador (Blanchard e Blanchard, 1977a; Blanchard *et al.*, 2003).

No entanto, quando um rato está sendo atacado, isto é, está apresentando comportamento defensivo, ele necessita proteger zonas específicas do seu corpo, quando, então, assume uma postura ereta defensiva, com a qual ele pode rodar como um pivô e expor áreas menos vitais ao atacante. Também interpretado como comportamento defensivo, o ato de boxear é muito dependente das vibrissas. Fato que foi confirmado por meio da vibrissectomia, quando houve redução de noventa por cento no comportamento de boxear (Blanchard *et al.*, 1979). Caso o boxear revele-se ineficaz na prevenção de ataques, o defensor pode se deslocar para trás, em uma postura supina, para então empurrar o atacante com as patas. Esse é um comportamento relativamente comum em ratos e hamsters, e menos comum em camundongos (Blanchard *et al.*, 2003).

No comportamento ofensivo, clássicos padrões de movimentos são observados, como, perseguição; mordidas; ataques laterais e dorsais; e, a imobilização – quando o perseguidor, após atacar o dorso do animal, se mantém em cima dele, imobilizando-o a fim de mantê-lo dominado (Blanchard *et al.*, 2003).

Também é necessário fazer menção para fatos de derrota e medo após confronto agressivo. Scott (1966) descreveu que uma história de derrota reduz drasticamente a tendência de um camundongo efetivar um comportamento ofensivo. Em ratos também se observa o mesmo comportamento (Blanchard *et al.*, 2001). Essa influência do medo ultrapassa a derrota co-específica, quando, a exposição a um predador pode também diminuir profundamente a agressão ofensiva (Blanchard *et al.*, 1989). Esse achado é importante quando ocorrem repetidos encontros agressivos, como no modelo residente-intruso, visto a salvaguardar a pureza dos comportamentos a serem analisados.

### **1.5 CIRCUITOS NEURAIS PARA O COMPORTAMENTO AGRESSIVO E INDÍCIOS DA PARTICIPAÇÃO NEUROMODULADORA DA AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-DORSAL**

Em 1973, Clemente e Chase sugeriram quais poderiam ser as estruturas centrais envolvidas nas reações agressivas, onde o hipotálamo poderia ser o local de elaboração de tais padrões comportamentais, que os núcleos amigdalianos exerceriam influência modulando a atividade do hipotálamo, enquanto a área septal atuaria inibindo estes padrões por suprimir informações, tanto de origem amigdaliana quanto hipotalâmica. Atualmente, por meio de técnicas como registros elétricos, lesões eletrolíticas específicas, estimulações eletroquímicas, imunistoquímica para marcadores de atividade neuronal, as estruturas do SNC que participam da rede neural e que modulam o comportamento agressivo ainda seguem sendo identificadas. Áreas como o hipotálamo lateral, AMe, ACO e

BNST têm papel chave no controle da resposta agressiva (Huntingford e Turner, 1987), e, áreas como o córtex somatossensorial, auditivo, orbital e região retrosplenial do córtex cingulado têm participação na motivação da agressão (Ferris *et al.*, 2008). A PAG exerce o papel de integrar e emitir a resposta final do comportamento agressivo (de Almeida e Lucion, 1997).

O córtex frontal possui controle inibitório sobre a maioria dos comportamentos motivados, incluindo a agressão e a defesa, idéia ratificada pelas conexões entre o córtex pré-frontal e estruturas subcorticais envolvidas nas respostas emocionais, bem como, pelos efeitos de lesões no córtex frontal sobre a impulsividade e a agressão (Machado e Bachevalier, 2006).

Para os núcleos do hipotálamo, como parte integrante do controle da agressão, Olivier e colaboradores (1983) sugeriram, a partir de suas pesquisas em ratos machos diante de um confronto residente-intruso, que existem duas distintas atuações do hipotálamo medial na agressão, sendo a sua região mais anterior relacionada com a modulação da agressão defensiva e a parte mais posterior à agressão ofensiva.

Porém, é ao abordar a área hipotalâmica anterior (AHA) que surgem as maiores evidências apoiando o papel crucial desta área no comportamento de ataque. O comportamento agressivo de ataque pode ser incitado por estimulação elétrica em uma área hipotalâmica específica, ou seja, a área hipotalâmica de ataque (AHA), que está localizada ventralmente e inclui a área hipotalâmica intermediária (AHI) e a parte ventrolateral do núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH) (Kruk *et al.*, 1983; Lammers *et al.*, 1988; Kruk, 1991;). Deste modo, dentro do complexo amigdaliano, a maior parte das fibras oriundas da AHI são confinadas na AMe e, a AMe, por si só, também é moderadamente inervada por

fibras dorsomediais do VMH (Roeling *et al.*, 1994). Adams (1971), Olivier (1977) e Olivier e colaboradores (1983) observaram que, lesões na AHA reduziram a agressão incitada por um intruso em contextos territoriais e, por fim, Delville e colaboradores (2000), Kollack-Walker e Newman (1995) e Halász e colaboradores (2002a) demonstraram que esta área é fortemente ativada em várias espécies quando há lutas territoriais. Além disso, a estimulação elétrica unilateral da AHA induz a ativação de *c-fos* não só ipsilateralmente, mas também na AHA contralateral (Halász *et al.*, 2002b). Em conjunto, estes dados demonstram claramente o papel desempenhado pela AHA na indução de ataque. Em ambientes naturais, comportamentos de ataque são efetivos quando as estruturas cerebrais moduladoras – AMe, córtex pré-frontal e área septal – são suprimidas (Kruk, 1991; Siegel, 1991; Siegel e Brutus, 1990). O componente liberador do ataque presumivelmente não é confinado ao hipotálamo, mas inclui essas regiões moduladoras em diferentes graus, dependendo do ambiente em que respostas agressivas são funcionalmente necessárias (Roberts e Nagel, 1996).

Haller e colaboradores (2006b), ao analisar o comportamento agressivo de dois tipos de camundongos (LAL – longa latência de ataque e SAL – curta latência de ataque), observaram que animais do grupo LAL, após encontro agressivo, tiveram ativação de áreas como o septo lateral, BNST, AMe, núcleo paraventricular do hipotálamo, PAG, locus ceruleus, hipotálamo anterior e *tuber cinereum* (essas duas últimas são análogas da AHA de ratos). Tais áreas apresentaram padrão semelhante às estruturas ativas na agressão territorial de camundongos, ratos e hamsters, e, em ratas não lactantes. Já os animais do grupo SAL apresentaram ativação na ACe, AL (amígdala lateral) e PAG ventrolateral, e não foi encontrada ativação no septo lateral e PAG dorsolateral – padrão

semelhante aos achados em outros modelos de agressão violenta. Desta forma, os autores sugeriram que a excessiva ativação nas estruturas demarcadas no grupo SAL, foi acompanhada de uma menor ativação do septo lateral e PAG dorsolateral, ou seja, essas áreas foram suprimidas, facilitando a expressão de ataques violentos.

Vários dados apontam para o papel modulador comportamental dos diferentes núcleos amigdalianos. A via eferente mais bem documentada refere-se à ST, no qual atividade originada da AMe facilita o comportamento defensivo ou suprime o ataque predatório quando tais fibras têm como alvo o hipotálamo medial (Block *et al.*, 1980; Brutus *et al.*, 1986; Egger e Flynn, 1963; Stoddard-Apter e MacDonnell, 1980). Em contraste, fibras oriundas da ACe e AL, que fazem eferência no hipotálamo lateral e na PAG, demonstraram estar associadas com a supressão do comportamento defensivo e facilitação para respostas ofensivas (Block *et al.*, 1980; Brutus *et al.*, 1986; Egger e Flynn, 1963). Desta forma, alguns subnúcleos do complexo amigdaliano facilitam o comportamento ofensivo, ao passo que outros suprimem o comportamento defensivo. É provável que eferências dos núcleos amigdalianos, como um todo, para o hipotálamo medial e PAG componham rotas diretas, e, eferências para a BNST rotas indiretas (Holstege *et al.*, 1985; Watson *et al.*, 1983).

Ainda, com relação à participação da AMe no circuito neuronal de modulação do comportamento agressivo, Knapska e colaboradores (2007) referiram que ela mantém eferência com a AHA (como visto na FIGURA 2), possibilitando a compreensão de sua ação neuromoduladora para a AHA, que, por sua vez, faz eferência para a PAG (ver FIGURA 4), que, então, é ativada e responde diretamente na ação comportamental da agressão.



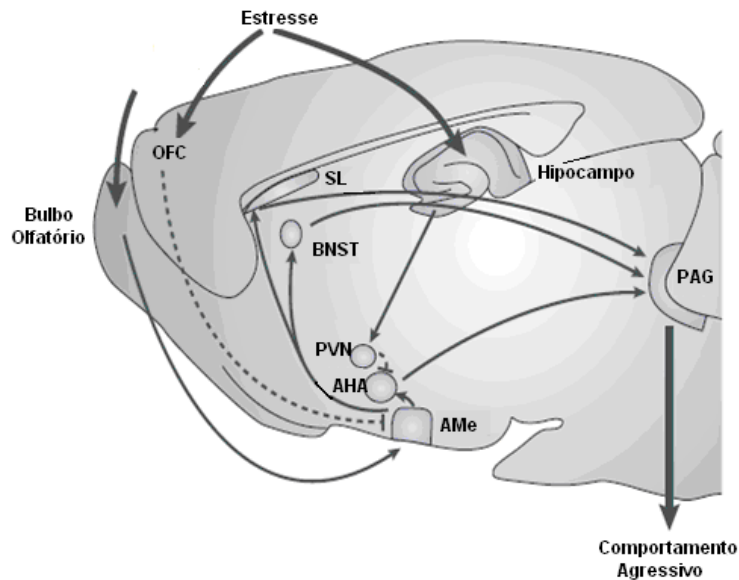


FIGURA 4 Vias neuroanatômicas da agressão em roedores. Informações oriundas do bulbo olfatório são processadas pela amígdala medial (AMe) e repassadas para o septo lateral (SL), núcleo próprio da estria terminal (BNST) e área hipotalâmica anterior (AHA). Estas áreas cerebrais fazem conexão para a substância periaquedutal (PAG) que, então, atua promovendo o comportamento agressivo específico de roedores. (PVN – núcleo paraventricular; OFC – córtex olfatório). Figura adaptada de Nelson e Trainor (2007).

Em experimentos a respeito da ação da MePD, Kollack-Walker e Newman (1995) investigaram os padrões de expressão de *c-fos* no complexo amigdaliano de hamsters no teste residente-intruso. Tais autores encontraram ativação na AMe e ACO, porém, não acharam ativação na ABL, tanto no animal dominante, quanto no subordinado. Também com o auxílio da técnica de imunistoquímica para o gene *c-fos*, Veening e colaboradores (2005) por sua vez, encontraram um aumento na imunorreatividade à proteína do gene *c-fos* na MePD em resposta a encontros sexuais e agressivos, sendo que a porção caudal dessa região mostrou maior resposta para o comportamento agressivo do que o sexual.

Em hamsters adultos, Delville e colaboradores (2000) observaram que áreas cerebrais como a MePD, BNST, hipotálamo ventrolateral e parte

dorsolateral da PAG estão associadas à agressão ofensiva por apresentarem conexões recíprocas com o hipotálamo anterior, sendo assim, tais estruturas configuram um circuito neural. Swanson (2000) propôs que diferentes subnúcleos são mais ativos de acordo com o contexto social. Por exemplo, a MePV e VMH dorsomedial estariam mais envolvidas na regulação da agressão defensiva, enquanto que a MePD, por sua vez, em contextos de agressão ofensiva. Em outro estudo, envolvendo agressão maternal em camundongos fêmeas, Hasen e Gammie (2006) encontraram aumento na atividade neuronal da MePD quando um novo macho era exposto à fêmea, indicando que essa região desempenha respostas agressivas em camundongos fêmeas assim como o faz em ratos.

Em conjunto, há várias evidências experimentais sugerindo a MePD como moduladora do comportamento agressivo em ratos, o que será igualmente estudado na presente dissertação.

## **1.6 MODELOS DE ESTUDO DO COMPORTAMENTO AGRESSIVO**

O comportamento agressivo não é um fenômeno único e indissociável em relação a outros tipos de comportamento, fato que o torna proporcionalmente mais complexo e de maior dificuldade de interpretação. As cinco variedades de comportamento que mais têm sido estudadas sob a rubrica de agressão em pesquisas com animais são: (i) "jogos de luta", atividades de animais pré-púberes de uma variedade de espécies (Pellis e Iwaniuk, 2000), (ii) "agressão ofensiva", observado mais claramente nas interações pós-púberes entre machos (Adams, 2006; Blanchard e Blanchard, 1984); (iii)

"agressão defensiva", observada como resposta ao ataque, normalmente diante de um predador ou de um animal da mesma espécie (Blanchard e Blanchard, 1977b; Gregg e Siegel, 2001); (iv) "agressão maternal", ocorre quando uma fêmea pós-parturiente luta contra um intruso que ameace seus filhotes ou território (Brain e Al-Maliki, 1979; Veiga *et al.*, 2007; Giovenardi *et al.*, 1998), e (v) "agressão predatória", envolvendo um ataque a um animal que, então, normalmente, serve como alimento (Karli, 1956).

Os modelos de estudo da agressividade em animais se baseiam em situações nas quais as respostas agressivas são potencializadas. Os principais modelos são: 1) comportamento materno agressivo, no qual ratas lactantes apresentam alta agressividade até duas semanas após o parto; 2) confrontos residente-intruso, quando um animal intruso é colocado na caixa do animal residente, freqüentemente com o propósito de ameaçar o sucesso reprodutivo do residente em seu território; 3) dominância ou comportamento agressivo territorial, que é feito em colônias de, pelo menos, dois machos e uma fêmea; 4) isolamento social, no qual a privação de contato com outros animais induz a agressividade; e, 5) instigação ou provocação social, no qual as respostas agressivas são potencializadas após provocação prévia (Miczek *et al.*, 2004; Nelson e Trainor, 2007; Rasia-Filho *et al.*, 2008).

O escopo desta dissertação de mestrado é a abordagem dos modelos de isolamento social, territorial (fazendo-se uso do paradigma residente-intruso) e o estresse por contenção manual.

Em virtude de o rato ser um animal que vive em ambiente social, a privação do contato com outros ratos torna o modelo de isolamento social um importante protocolo de estudo de desordens neurológicas, como a esquizofrenia,

a ansiedade e a depressão. Ambientes de isolamento também mostraram ser mais efetivos em fêmeas do que em machos (Hacht *et al.*, 1963). Trata-se de um modelo geralmente usado em ratos juvenis (a partir de 21 dias) para avaliar alterações produzidas pelo seu ambiente de confinamento, nos quais os animais podem apenas vocalizar, cheirar e ouvir informações oriundas de outros ratos no mesmo recinto, por oito semanas ou mais, caracterizando um isolamento crônico (Lapiz *et al.*, 2003). Dependendo da idade que o animal é submetido ao isolamento, ocorrem diversas mudanças neuroanatômicas e de neurotransmissibilidade, já que estruturas cerebrais apresentam diferentes tempos de desenvolvimento estruturais. Ichikawa e colaboradores (1993) observaram redução no número de sinapses na AMe e diminuição da área cortical, especialmente na região parietal (envolvida no processamento de informações visuais) em ratos mantidos isolados a partir de quarenta dias pós-natal até oito semanas. A fim de elucidar o potencial efeito estressor do isolamento agudo em ratos, Frisone e colaboradores (2002), expuseram ratos de quinze a vinte e um dias de idade ao isolamento social durante seis horas/dia, e observaram que no quarto dia pós-isolamento houve aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona e alopregnalona circulantes em até uma hora após a separação social, indicando, dessa forma, que o isolamento agudo é passível de gerar mudanças nos níveis dessas substâncias envolvidas no estresse. Ratos isolados são agressivos, neofóbicos, hiponeofágicos e apresentam alta reatividade diante da manipulação humana (Wongwitdecha e Marsden, 1996).

Um dos melhores modelos experimentais que incita a agressão territorial é o paradigma residente-intruso (Miczek *et al.*, 2004). Nesse modelo, preconiza-se manter o rato residente em sua caixa por no mínimo quatro semanas (podendo

chegar até doze meses), como forma de ele estabelecer tempo prévio de dominância territorial, usualmente acompanhado de fêmea da mesma espécie. Quando o rato é o animal em estudo, aconselha-se introduzir um pedaço de madeira para que o residente urine na mesma a fim de demarcar seu território. Já, quando o camundongo é o animal em estudo, não é necessário tal procedimento. Geralmente esse protocolo é usado para ratos da linhagem *Long-Evans* ou camundongos *Swiss-Webster*, animais estes que apresentam altos níveis basais de agressividade (Heinrichs e Koob, 2006). Porém, em experimentos onde não há tais espécies animais disponíveis, deve-se encontrar outras formas de os tornarem mais agressivos, como é o caso dos ratos *Wistar*, que são considerados por Albonetti e Farabollini (1994) e Veening e colaboradores (2005) como pertencentes a uma linhagem de animais que não apresentam níveis altos e estáveis de comportamento agressivo. O modelo residente-intruso é efetivo pelo fato do rato residente determinar que seu local, onde também está inserida sua respectiva fêmea, é de seu domínio. A inserção de um rato intruso (com peso corporal vinte por cento menor que o peso do rato residente) no local de criação do rato residente afeta o domínio deste sobre tal território, tanto espacialmente quanto pelo sucesso reprodutivo se houver, ocasionando reações agressivas ofensivas contra o animal não-familiar (Moyer, 1968).

Abordando o estresse por contenção manual, Donovan e Brown (2006) descreveram que o manuseio inadequado do animal pode resultar em aumento do estresse. Muitos procedimentos experimentais exigem breves manipulações, como a necessária imobilização do animal durante a infusão de drogas (Tang *et al.*, 2007), sendo tal procedimento caracterizado como um estresse indolor (Shibasaki *et al.*, 1995). Marcuzzo e colaboradores (2007) apontaram que, ao conter ratos por

1 hora/dia houve decréscimo no número de espinhos dendríticos da MePD, ao passo que a contenção crônica (6 horas/dia por 28 dias consecutivos) não se relacionou com tal decréscimo na densidade de espinhos dendríticos da MePD. Ou seja, é possível que a MePD responda modulando o número de espinhos dendríticos e de contatos sinápticos preferentemente devido ao estresse agudo, mas não ao estresse crônico.

Desta forma, na tentativa de desenvolver um modelo que incitasse o comportamento agressivo em ratos *Wistar* e que os níveis de agressividade respeitassem os fatores “teto ou chão”, ou seja, nem tão pouco que não possa ser caracterizado como um rato agressivo, nem tão alto que extrapolasse os níveis normais de agressividade, um novo protocolo de agressão territorial para ratos adultos foi elaborado. Tal protocolo leva em consideração o modelo de isolamento social por 14 dias, ou seja, um isolamento subagudo; o modelo residente-intruso, porém, sem a presença de uma fêmea (tornando o modelo puramente de dominância territorial espacial) e o modelo de estresse por suave contenção manual durante 1 minuto, como o empregado para microinjeções cerebrais.

## **1.7 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FOS**

A compreensão do circuito neural do comportamento agressivo foi, durante muitos anos, baseada em estudos que faziam uso de técnicas de estimulação química e elétrica, frequentemente causando lesões em discretas áreas cerebrais para analisar certos tipos comportamentais (Ricci *et al.*, 2007; Albert e Walsh, 1984). Mais recentemente, técnicas imunistoquímicas para marcação de

proteínas codificadas por específicos genes, lançaram luz na identificação de diversas áreas cerebrais presumivelmente envolvidas no comportamento agressivo (Ricci *et al.*, 2007; Knyshevski *et al.*, 2005). Portanto, na tentativa de elucidar a participação da MePD na modulação do comportamento agressivo ofensivo neste novo protocolo de agressão (como exposto na página anterior), fez-se uso da técnica de imunistoquímica na presente pesquisa.

O gene *c-fos* é responsável pela codificação de uma proteína denominada Fos, que é parte constituinte do fator de transcrição AP-1 (Kovács, 2008). A expressão da proteína do gene *c-fos* é desencadeada por diversos fatores, tendo como principais, o aumento dos níveis intracelulares de AMP e/ou de cálcio (geralmente pela abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes), ou pela ligação de substâncias que produzem um sinal celular específico para a expressão desta proteína, como exemplo, a somatotropina (Hoffman *et al.*, 1993).

O gene *c-fos* é parte de um grupo gênico chamado de “genes de ativação imediata”. Tais genes são transcritos imediatamente após algum estímulo específico, gerando proteínas que, em geral, são fatores de transcrição para outros genes. Além do *c-fos*, fazem parte deste grupo genes como o *c-jun*, *c-myc*, entre outros (Hoffman *et al.*, 1993; Hoffman e Lyo, 2002; Kovács, 2008).

A cinética da expressão da proteína Fos é bastante dinâmica e transitória, com o pico de sua detecção imunistoquímica sendo encontrado entre 90 e 120 minutos (Hoffman *et al.*, 1993). Devido ao fato de a proteína Fos ser expressa mediante diversos fatores, ela vem sendo utilizada como um marcador de atividade neuronal, embora ainda passível de contestação. Não obstante, os principais motivos para o sucesso do uso da expressão desta proteína como marcador de atividade neuronal são os seguintes: (i) é expressa em níveis baixos

no cérebro intacto sob condições basais; (ii) é induzida em resposta a diversos sinais, tanto intra quanto extracelulares, incluindo íons, neurotransmissores, hormônios e drogas; (iii) possui resposta transitória; (iv) é de detecção simples, tanto da proteína como do RNAm; e, (v) por fazer parte do fator de transcrição AP-1, está envolvida na transcrição de diversos genes tardios (Kovács, 2008).

## 1.8 SOMATOSTATINA

Somatostatina, também conhecida como fator de inibição da liberação de somatotropina (SRIF) por sua ação descrita originalmente no hipotálamo, faz parte da família dos ciclopeptídeos, e seus receptores pertencem à família de receptores acoplados à proteína G (Csaba e Dournaud, 2001).

Dentre as clássicas funções da somatostatina estão inibições de uma vasta gama de secreção endócrina, a saber: na hipófise, inibe a liberação de hormônio de crescimento, prolactina e hormônio tireoestimulante; no trato gastrointestinal inibe a colecistocinina, gastrina, motilina, neurotensina e secretina; e, no pâncreas, inibe localmente a liberação de glucagon e de insulina (Genuth, 1994; Krantic *et al.*, 2004).

Além de ações periféricas da somatostatina, observa-se também sua ação como transmissor sináptico no SNC, atuando como um neuromodulador com efeitos neuroendócrinos, motores e nas funções cognitivas (Reichlin, 1983; Epelbaum, 1986; Schindler *et al.*, 1996). Ela exerce ação como um neurotransmissor em vias anatomicamente distintas e definidas e, como



neuromodulador, por ter a capacidade de modular a liberação de outros neurotransmissores (entre estes estão a serotonina, a acetilcolina e o glutamato).

Neurônios somatostatinérgicos são encontrados em grande número em todo o SNC, e dão origem a uma extensa rede de vias neuronais contendo somatostatina e axônios terminais em numerosas regiões cerebrais, incluindo diversas partes do córtex cerebral, do hipocampo, núcleos amigdalianos (McDonald e Mascagni, 2002), do hipotálamo, do tronco cerebral e da medula espinal (Lengiel *et al.*, 1989).

Há duas isoformas de SRIFs ativas: o tetradecapeptídeo SRIF-14, e sua porção amino-terminal estendida, o SRIF-28. Ambos são encontrados no SNC e periférico, sendo que a isoforma central predominante é o SRIF-14 (Krantic *et al.*, 2004). Já foram clonados 6 diferentes tipos de receptores para somatostatina (sst1, sst2A, sst2B, sst3, sst4 e sst5), sendo expressos em diferentes tecidos e ativados por segundos mensageiros (Pallis *et al.*, 2006). Como são expressos tanto na periferia quanto centralmente, discorreremos a seguir sobre sua presença em estruturas centrais do SN de ratos: 1) sst1: parte rostral dos núcleos periventriculares do hipotálamo; 2) sst2A: córtex cerebral, região CA1 do hipocampo, BNST, claustrum, complexo amigdaliano, locus ceruleus e núcleo do trato solitário; 3) sst2B: bulbo olfatório, córtex cerebral, formação hipocampal, núcleo septal e colículo superior; 4) sst3: córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo, complexo amigdaliano e cerebelo; 5) sst4: bulbo olfatório, córtex cerebral, hipocampo e caudado-putamen; 6) sst5: núcleo pré-óptico magnocelular, núcleo septal medial, área de Broca e substância inominata. Os autores afirmam que os receptores dos subtipos sst2A, sst2B e sst4 são os que apresentam maiores papéis

na transdução de sinais centrais somatostatinérgicos, de acordo com suas localizações celulares (Csaba e Dournaud, 2001).

Duas categorias principais de neurônios somatostatinérgicos foram discriminados: aqueles que projetam à distância, a partir do seu soma (neurônios de longa projeção), e os de curtos neurônios GABAérgicos (interneurônios), agindo em microcircuitos. Os neurônios de longa projeção representam a inervação de 30% das projeções neuronais somatostatinérgicos da AL, que, então, inervam regiões distantes (área hipotalâmica pré-óptica), bem como os demais núcleos amigdalianos, exceto a ACe (Viollet *et al.*, 2008).

Dournaud e colaboradores (1996), ao estudarem o receptor *sst2A*, demonstraram que este tipo de receptor está associado a elementos somatodendríticos e axonais, sugerindo que ele está envolvido na transdução de sinais pré- e pós-sinápticos. Os mesmos autores ainda sugeriram que a somatostatina parece apresentar um papel crítico nos efeitos sobre a cognição, a expressão do comportamento emocional, o aprendizado e a memória.

Efeitos da somatostatina como neurotransmissor são principalmente inibitórios e são mediados por receptores *sst2*. Essa ação diz respeito à hiperpolarização dendrítica, por meio da ativação de canais de  $K^+$  voltagem-dependente ou voltagem-independente (Jiang *et al.*, 2003; Meis *et al.*, 2005) e da inibição de canais de  $Ca^{2+}$  voltagem-dependente e sua consecutiva indução de corrente de  $Ca^{2+}$  (Viana e Hille, 1996; Galarraga *et al.*, 2007). Porém, há diversos estudos relatando sua ação tanto excitatória quanto inibitória como em estudos de Saha e colaboradores (2002) e também de Delfs e Dichter (1983), quando houve excitação e inibição em neurônios corticais em cultura. Tais contradições parecem

ter relação dose-dependente, sendo que altas doses apresentam efeitos inibitórios e doses baixas, excitatórios (Defs e Dichter, 1983).

Na AMe e ACe, Saha e colaboradores (2002) observaram que a somatostatina preferentemente modula respostas inibitórias locais. Dong e Swanson (2006) analisaram que a BNST dorsomedial, que tem conexão com a MePD, mantém forte contribuição na ação neuromoduladora da somatostatina na sua porção parvicelular.

Deste modo, após resultados do estudo da detecção da proteína Fos quanto à participação da MePD no comportamento agressivo e pelo fato de não haver estudos elucidativos quanto aos efeitos da somatostatina na MePD na modulação do comportamento agressivo em machos, tal substância foi microinjetada na MePD neste estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams DB. Defence and territorial behaviour dissociated by hypothalamic lesions in the rat. *Nature*. 1971; 232(5312):573-4.

Adams DB. Brain mechanisms of aggression behavior: An updated review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2006; 30(3):304-18.

Agglenton JP, Blindt MS. Effects of amygdaloid and amygdaloid-hipocampal lesions on object recognition and spatial working memory in rats. *Behav Neurosci*. 1989; 103(5):962-74.

Albert DJ, Walsh ML. Neural systems and the inhibitory modulation of agonistic behavior: a comparison of mammalian species. *Physiol Behav*. 1984; 32(1):143-5.

Albert DJ, Walsh ML, Jonik RH. Aggression in humans: what is its biological foundation? *Neurosci Biobehav Rev*. 1993; 17(4):405-25.

Albonetti ME, Farabollini F. Social stress by repeated defeat: effects on social behaviour and emotionality. *Behav Brain Res*. 1994; 62(2):187-93.

Allen JP, Allen CF. Role of amygdaloid complexes in the stress-induced release of ACTH in the rat. *Neuroendocrinol*. 1974; 15(3-4):220-30.

Alheid GF, Heimer L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience*. 1988; 27(1):1-39.

Alheid GF, de Olmos JS, Beltramino CA. Amygdala and extended amygdala. In: Paxinos G. *The rat Nervous System*. San Diego: Academic Press. 1995:495-598.

Azmitia EC, Segal M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol*. 1978; 179:641-668.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. 2ª ed. Jorge Alberto Quillfeldt *et al*. Porto Alegre: Artmed; 2002. 855 p.

Bennett C, Liang KC, McGaugh JL. Depletion of adrenal catecholamines alters the amnesic effect of amygdala stimulation. *Behav Brain Res*. 1985; 15(2):83-91.

Berkowitz L. Aversively simulated aggression: some parallels and differences in research with animals and humans. *Am Psychol*. 1983; 38(11):1135-44.

Bian X, Yanagawa Y, Chen WR, Luo M. Cortical-lick functional organization of the pheromone-processing circuits in the medial amygdala. *J Neurophysiol*. 2008; 99: 77-86.

Blanchard DC, Blanchard RJ. Inate and conditioned reactions to thread in rats with amygdaloid lesions. *J. Comp. Physiol.* 1972; 81:281-90.

Blanchard RJ, Blanchard DC. Aggressive behavior in the rat. *Behav Biol.* 1977a; 21(2):197-224.

Blanchard RJ, Takahashi LK, Fukunaga KK, Blanchard DC. Functions of the vibrissae in the defensive and aggressive behavior of the rat. *Aggress Behav.* 1977b; 3:231-40.

Blanchard RJ, O'Donnell V, Blanchard DC. Attack and defensive behaviors in the albino mouse (*Mus musculus*). *Aggress. Behav.* 1979; 5:341-52.

Blanchard DC, Blanchard RJ. Inadequacy of pain-aggression hypothesis revealed in naturalistic settings. *Aggress Behav.* 1984; 10:33-46.

Blanchard DC, Fukunaga-Stinson C, Takahash LK, Blanchard RJ, Flannelly KJ. Dominance and aggression in social groups of male and female rats. *Behav Processes.* 1984; 9:31-48.

Blanchard DC, Rodgers RJ, Hori K, Hendrie CA, Blanchard RJ. Attenuation of defensive threat and attack in wild rats (*Rattus rattus*) by benzodiazepines. *Psychopharmacology.* 1989; 97:392-401.

Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001; 25:205-218.

Blanchard RJ, Wall PM, Blanchard DC. Problems in the study of rodent aggression. *Horm Behav.* 2003; 44(3):161-70.

Block CH, Siegel A, Edinger H. Effects of amygdaloid stimulation upon trigeminal sensory fields of the lip that are established during hypothalamically-elicited quiet biting attack in the cat. *Brain Res.* 1980; 197(1):39-55.

Bolhuis JJ, Fitzgerald RE, Dijk DJ, Koolhaas JM. The corticomедial amygdale and learning in an agonistic situation in the rat. *Physiol Behav.* 1984; 32(4):575-9.

Boehm S, Betz H. Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors. *J Neurosci.* 1997; 17(11):4066-75.

Brain PF, Al-Maliki S. Effects of lithium chloride injections on rank-related fighting, maternal aggression and locust-killing responses in naive and experienced 'TO' strain mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1979; 10(5):663-9.

Bressler SC, Baum MJ. Sex comparison of neuronal *Fos* immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. *Neuroscience.* 1996; 71:1063-72.

Brutus M, Shaikh MB, Edinger H, Siegel A. Effects of experimental temporal lobe seizures upon hypothalamically elicited aggressive behavior in the cat. *Brain Res.* 1986; 366(1-2):53-63.

Canteras NS. Análise crítica dos sistemas neurais envolvidos nas respostas de medo inato. *Rev Bras Psiquiatr.* 2003; 25(2):21-4.

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *J Comp Neurol.* 1995; 360(2):213-45.

Carrer HF, Whitmoyer DI, Sawyer CH. Effects of hippocampal and amygdaloid stimulation on the firing of preoptic neurons in the proestrus female rats. *Brain Res.* 1978; 142: 363-67.

Clemente CD, Chase MH. Neurological substrates of aggressive behavior. *Ann. Rev. Physiol.* 1973; 35:329-56.

Csaba Z, Dournaud P. Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides.* 2001; 35(1):1-23.

Dall'Oglio A, Gehlen G, Achaval M, Rasia-Filho AA. Dendritic branching features of Golgi-impregnated neurons from the "ventral" medial amygdala subnuclei of adult male and female rats. *Neurosci Lett.* 2008; 439(3):287-92.

Dayas CV, Buller KM, Day TA. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: Evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *Eur J Neurosci.* 1999; 11(7):2312-22.

David JT, Cervantes MC, Trosky KA, Salinas JA, Delville Y. A neural network underlying individual differences in emotion and aggression in male golden hamsters. *Neuroscience.* 2004; 126(3):567-78.

Davis M. The role of the amygdala in conditioned fear. In: Aggleton JP. *The Amygdala.* New York: Wiley-Liss; 2000. 255-306 p.

de Almeida RM, Lucion AB. 8-OH-DPAT in the median raphe, dorsal periaqueductal gray and corticomедial amygdala nucleus decreases, but in the medial septal area it can increase maternal aggressive behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 1997; 134(4):392-400.

Delfs JR, Dichter MA. Effects of somatostatin on mammalian cortical neurons in culture: physiological actions and unusual dose response characteristics. *J Neurosci.* 1983; 3(6):1176-86.

Delgado JMR. Neural constellations in aggressive behavior. In *Aggression and Violence: A Psychobiological and Clinical Approach.* Valzelli I, Morgese I. Milan: Edizione Saaint Vincent; 1980. 82-97 p.

Delville Y, De Vries GJ, Ferris CF. Neural connections of the anterior hypothalamus and agonistic behavior in golden hamsters. *Brain Behav Evol.* 2000; 55(2):53-76.

de Olmos JS, Heimer RL. The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 877:1-32.

de Olmos J, Beltramino CA, Alheid GF. Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. In *The Rat Nervous System*. Paxinos G. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004. 509–603 p.

De Vries GJ. Studying neurotransmitter systems to understand the development and function of sex differences in the brain: the case of vasopressin. In *Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones*. Micevych PF, Hammer RP Jr. New York: Cambridge University Press; 1995. 254–78 p.

Dielenberg RA, Hunt GR, McGregor LS. When a Rat Smells a Cat: The distribution of FOS immunoreactivity in the rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience.* 2001; 104(4):1085-97.

Dominguez JM, Hull EM. Stimulation of the medial amygdala enhances medial preoptic dopamine release: implications for male rat sexual behavior. *Brain Res.* 2001; 917(2):225-9.

Dong HW, Swanson LW. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, dorsomedial nucleus: implications for cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and drinking responses. *J Comp Neurol.* 2006; 494(1):75-107.

Dong HW, Petrovich G, Swanson LW. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Rev.* 2001; 38:192-246.

Donovan J, Brown P. Handling and restraint. *Curr Protoc Immunol.* 2006; Capítulo 1: Unidade 1.3.

Dournaud P, Gu YZ, Schonbrunn A, Mazella J, Tannenbaum GS, Beaudet A. Localization of the somatostatin receptor SST2A in rat brain using a specific anti-peptide antibody. *J Neurosci.* 1996; 16(14):4468-78.

Egger MD, Flynn JP. Effects of electrical stimulation of the amygdala on hypothalamically elicited attack behavior in cats. *J Neurophysiol.* 1963; 26:705-20.

Epelbaum J. Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol.* 1986; 27(1):63-100.

Everitt B. Limbic lobe and olfactory pathways. In: Berry MM, Bannister LH, Standring SM. *Gray's Anatomy*. London: Churchill Livingstone; 1995. 1115-41 p.

Ferris CF, Stolberg T, Kulkarni P, Murugavel M, Blanchard R, Blanchard DC, Febo M, Brevard M, Simon NG. Imaging the neural circuitry and chemical control of aggressive motivation. *BMC Neurosci.* 2008; 9:111.

Flannelly KJ, Flannelly L. Time course of postpartum aggression in rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol.* 1987; 101:101-3.

Frankfurt M, Siegel RA, Sim I, Wuttke W. Cholecystokinin and substance P concentrations in discrete areas of the rat brain: sex differences. *Brain Res.* 1985; 358(1-2):53-8.

Frisone DF, Frye CA, Zimmerberg B. Social isolation stress during the third week of life has age-dependent effects on spatial learning in rats. *Behav Brain Res.* 2002; 128(2):153-60.

Galarraga E, Vilchis C, Tkatch T, Salgado H, Tecuapetla F, Perez-Rosello T, *et al.* Somatostatinergic modulation of firing pattern and calcium-activated potassium currents in medium spiny neostriatal neurons. *Neuroscience.* 2007; 146(2), 537–54.

Genuth SM. The endocrine system. In: Berne RM, Levy MN. *Physiology.* 4rd ed Mosby Year Book; 1994. 851-75 p.

Giovenardi M, Padoin MJ, Cadore LP, Lucion AB. Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. *Physiol Behav.* 1998; 63(3):351-9.

Giovenardi M, de Azevedo MS, da Silva SP, Hermel Edo E, Gomes CM, Lucion AB. Neonatal handling increases fear and aggression in lactating rats. *Physiol Behav.* 2005; 86(1-2):209-17.

Gloor P. The amygdaloid system. In *The Temporal Lobe and Limbic System.* Gloor P. New York: Oxford University Press; 1997. 591–721 p.

Gregg TR, Siegel A. Brain structures and neurotransmitters regulating aggression in cats: implications for human aggression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2001; 25(1):91-140.

Grota LJ, Ader R. Behavior of lactating rats in a dual-chambered maternity cage. *Horm Behav.* 1974; 5(4):275-82.

Groove EA. Efferent connections of the substantia innominata in the rat. *J Comp Neurol.* 1988; 277:347-382.

Guillamón A, Segovia S. Sex Differences in the Vomeronasal System. *Brain Res Bull.* 1997; 44(4):377-82.

Guirado S, Real MA, Dávila JC. Immunohistochemically defined areas in the medial amygdala in the developing and adult mouse. *Brain Res Bull.* 2008; 75: 214-217.



- Hacht A, Wiberg GS, Balazs T, Grice HC. Long-term isolation stress in rats. *Science*. 1963; 208:507.
- Halász J, Liposits Z, Kruk MR, Haller J. Neural background of glucocorticoid dysfunction-induced abnormal aggression in rats: involvement of fear- and stress-related structures. *Eur J Neurosci*. 2002a; 15(3):561-9.
- Halász J, Liposits Z, Meelis W, Kruk MR, Haller J. Hypothalamic attack area-mediated activation of the forebrain in aggression. *Neuroreport*. 2002b; 13(10):1267-70.
- Haller J, Kruk MR. Normal and abnormal aggression: human disorders and novel laboratory models. *Neurosci Biobehav Rev*. 2006a; 30(3):292-303.
- Haller J, Tóth M, Halasz J, De Boer SF. Patterns of violent aggression-induced *c-fos* expression in male mice selected for aggressiveness. *Physiol Behav*. 2006b; 88(1-2):173-82.
- Hasen NS, Gammie SC. Maternal aggression: New insights from Egr-1. *Brain Res*. 2006; 1108(1):147-56.
- Heinrichs SC, Koob GF. Application of experimental stressors in laboratory rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2006; Chapter 8:Unit 8.4.
- Herbert H, Saper CB. Cholecystokinin-galanin, and corticotropin-releasing factor-like immunoreactive projections from the nucleus of the solitary tract to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 1990; 293:581-598.
- Hess WR, Brugger M. Das subkortikale Zentrum der affektiven Abwehrreaktion. *Helv Physiol Pharmacol Acta*. 1943; 1:33-52.
- Hines M, Allen LS, Gorski RA. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of stria terminalis of the rat. *Brain Res*. 1992; 579(2):321-6.
- Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG. *c-fos* and related immediate early gene products as markers as activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*. 1993; 14(3):173-213.
- Hoffman GE, Lyo D. Anatomical Markers of Activity in Neuroendocrine Systems: Are we all 'Fos-ed out'? *J Neuroendocrinol*. 2002; 14(4):259-68.
- Holstege G, Meiners L, Tan K. Projections of the bed nucleus of the stria terminalis to the mesencephalon, pons, and medulla oblongata in the cat. *Exp Brain Res*. 1985; 58(2):379-91.
- Huntingford FA, Turner AK. *Animal Conflict*. New York: Chapman and Hall; 1987. 448 p.

- Ichikawa M, Matsuoka M, Mori Y. Effect of differential rearing on synapses and soma size in rat amygdaloid nucleus. *Synapse*. 1993; 13(1):50-6.
- Jiang N, Furue H, Katafuchi T, Yoshimura M. Somatostatin directly inhibits substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal dorsal horn in vitro. *Neurosci Res*. 2003; 47(1), 97–107.
- Jones BE, Moore RY. Ascending projections of the locus ceruleus in the rat II. Autoradiographic study. *Brain Res Bull*. 1977; 127:23-53.
- Karli P. The Norway rat's killing response to the white mouse: an experimental analysis. *Behaviour*. 1956; 10:81-103.
- Kling AS, Brothers LA. The amygdala and social behavior. In: Agglenton JP. *The Amygdala*. New York: Wiley-Liss; 1992. 353-77 p.
- Knapska E, Radwanska K, Werka T, and Kaczmarek L. Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiol Rev*. 2007; 87(4):1113-73.
- Knyshevski I, Connor DF, Harrison RJ, Ricci LA, Melloni RH Jr. Persistent activation of select forebrain regions in aggressive, adolescent cocaine-treated hamsters. *Behav Brain Res*. 2005; 159(2):277-86.
- Kollack-Walker S, Newman SW. Mating and agonistic behavior produce different patterns of Fos immunolabeling in the male *Syrian* hamster brain. *Neuroscience*. 1995; 66(3):721-36.
- Kondo Y. Lesions of the medial amygdala produce severe impairment of copulatory behavior in sexually inexperienced male rats. *Physiol Behav*. 1992; 51(5):939-43.
- Kondo Y, Arai Y. Functional association between the medial amygdala and the medial preoptic area in regulation of mating behavior in the male rat. *Physiol Behav*. 1995; 57(1):69-73.
- Kovács KJ. Measurement of immediate-early gene activation- *c-fos* and beyond. *J Neuroendocrinol*. 2008; 20(6):665-72.
- Krantic S, Goddard I, Saveanu A, Giannetti N, Fombonne J, Cardoso A *et al*. Novel modalities of somatostatin actions. *Eur J Endocrinol*. 2004; 151(6):643-55.
- Kruk MR, Van der Poel AM, Meelis W, Hermans J, Mostert PG, Mos J, Lohman AH. Discriminant analysis of the localization of aggression-inducing electrode placements in the hypothalamus of male rats. *Brain Res*. 1983; 260(1):61-79.
- Kruk MR. Ethology and pharmacology of hypothalamic aggression in the rat. *Neurosci Biobehav Rev*. 1991; 15(4):527-38.

Lammers JH, Kruk MR, Meelis W, van der Poel AM. Hypothalamic substrates for brain stimulation-induced attack, teeth-chattering and social grooming in the rat. *Brain Res.* 1988; 449(1-2):311-27.

Lapiz MDS, Fulford A, Muchimapura S, Mason R, Parker T, Marsden CA. Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior and neurotransmission. *Neurosci Behav Physiol.* 2003; 33(1): 13-29.

LeDoux JE. Emotion and amygdala. In: Aggleton JP. *The Amygdala.* New York: Wiley-Liss; 1982. 339-52 p.

Lehman MN, Winans SS. Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior. Autoradiographic and behavioral analyses. *Brain Res.* 1982; 240:27-41.

Lengiel AMJ, Grossman A, Rees LH, Besser GM. Dose-dependent effects of vasoactive intestinal polypeptide on somatostatin release from hypothalamic fragments in vitro. *Braz J Med Biol Res.* 1989; 22(10):1311-6.

Lu VN, Hattori Y, Moriwaki A, Hayashi Y, Hori Y. Inhibition of neurons in the rat medial amygdaloid nucleus in vitro by somatostatin. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995; 73(5):670-4.

Lucion AB, De Almeida RM. Role of the intruder in the aggressive behaviour of colonies of wild rats (*Rattus norvegicus*). In: Olivier B, Mos J, Slangen JL. *Animal models in Psychopharmacology.* Switzerland: Birkhauser; 1991. 347-56 p.

Machado CJ, Bachevalier J. The impact of selective amygdala, orbital frontal cortex, or hippocampal formation lesions on established social relationships in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Behav Neurosci.* 2006; 120(4):761-86.

Marcuzzo S, Dall'oglio A, Ribeiro MF, Achaval M, Rasia-Filho AA. Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats. *Neurosci Lett.* 2007; 424:16-21.

Maren S. Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. *Mol Neurobiol.* 1996; 13:1-22.

Matheus MG, de Lacerda JC, Guimarães FS. Behavioral effects of "vehicle" microinjected into the dorsal periaqueductal gray of rats tested in the elevated plus maze. *Braz J Med Biol Res.* 1997; 30(1):61-4.

McDonald AJ. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol.* 1998; 55: 257-332.

McDonald AJ, Mascagni F. Immunohistochemical characterization of somatostatin containing interneurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Res.* 2002; 943(2):237-44.

McGaugh JL. Involvement of the amygdala in neuromodulatory influences on memory storage. In: Aggleton JP. *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction*. New York: Wiley-Liss; 1992. 431-51 p.

McGaugh JL. Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. *Academic Science*. 1996; 93:13508-14.

Meisel RL, Sachs BS. The physiology of male sexual behavior. In: Knobil E, Neill ID. *The physiology of reproduction*. New York: Raven; 1994. 3-105 p.

Meis S, Sosulina L, Schulz S, Hollt V, Pape HC. Mechanisms of somatostatin-evoked responses in neurons of the rat lateral amygdala. *Eur J Neurosci*. 2005; 21(3), 755–62.

Meredith M, Westberry JM. Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. *J Neurosci*. 2004; 24: 5719-25.

Micevych PE, Matt DW, Go VLW. Concentrations of cholecystokinin, substance P, and bombesin in discrete regions of male and female rat brain: sex differences and estrogen effects. *Exp Neurol*. 1988; 100(2):416-25.

Miczek KA, Faccidomo S, de Almeida RM, Bannai M, Fish EW, Debold JF. Escalated aggressive behavior: new pharmacotherapeutic approaches and opportunities. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1036:336-55.

Miczek KA, de Almeida RM, Kravitz EA, Rissman EF, de Boer SF, Raine A. Neurobiology of escalated aggression and violence. *J Neurosci*. 2007; 27(44):11803-6.

Morgan HD, Watchus JA, Milgram NW, Fleming A. S. The long lasting effects of electrical stimulation of the medial preoptic area and the medial amygdala on maternal behavior in female rats. *Behav Brain Res*. 1999; 99(1):61-73.

Moyer KE. Kinds of aggression and their physiological basis. *Commun Behav Biol*. 1968; A2:65-7.

Nelson RJ, Trainor BC. Neural mechanisms of aggression. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8(7):536-46.

Newman SW. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 877:242-57.

Newman SW. Pheromonal signals access the medial extended amygdala: One node in a proposed social behavior network. *Horm Brain Behav*. 2002; 2(17):17-32.

Numan M, Numan MJ, English JB. Excitotoxic aminoacid injections into the medial amygdala facilitate maternal behavior in virgin female rats. *Horm Behav.* 1993; 27(1):56-81.

Olivier B. The ventromedial hypothalamus and aggressive behaviour in rats. *Aggress Behav.* 1977; 3:47-56.

Olivier B, Mos J, Van Der Heyden J, Hartog J. Serotonergic modulation of social interactions in isolated male mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1989a; 97(2):154-6.

Olivier B, Mos J, Tulp M, Schipper J, Bevan P. Modulatory action of serotonin in aggressive behaviour. In: Bevan P, Cools AR, Archer T. *Behavioural Pharmacology of 5-HT.* New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates; 1989b. 89-115 p.

Olivier B, Olivier-Aardema R, Wiepkema PR. Effect of anterior hypothalamic and mammillary area lesions on territorial aggressive behaviour in male rats. *Behav Brain Res.* 1983; 9(1):59-81.

Österlund M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Hurd YL. Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. *Mol Brain Res.* 1998; 54:175-180.

Ottersen OP. Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat. II. Afferent from the hypothalamus and the basal telencephalon. *J Comp Neurol.* 1980; 194:267-289.

Pallis EG, Spyraiki C, Thermos K. Chronic antidepressant treatment modulates the release of somatostatin in the rat nucleus accumbens. *Neurosci Lett.* 2006; 395(1):76-81.

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain Stereotaxic Coordinates.* San Diego: Academic Press, 1998. 367 p.

Pellis SM, Iwanuik AN. Comparative analysis of the role of postnatal development on the expression of play fighting. *Dev. Psychobiol.* 2000; 36(2):136-47.

Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Rev.* 2001; 38:247-289.

Pitkänen A. Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: Aggleton JP. *The Amygdala: A Functional Analysis.* Oxford: Oxford University-Press; 2000. 31-115 p.

Quagliotto E. Efeito da microinjeção de histamine e metil-histamina no núcleo pósterio-dorsal da amígdala medial sobre o controle da pressão arterial em ratos

[dissertação de mestrado]. [Porto Alegre – RS – Brasil]: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006. 104 p.

Quirk GJ, Reppas CB, LeDoux JE. Fear conditioning enhances short latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron*. 1995; 15(5):1029-39.

Rasia-Filho AA, Peres TM, Cubilla-Gutierrez FH, Lucion AB. Effect of estradiol implanted in the corticomedial amygdala on the sexual behavior of castrated male rats. *Braz J Med Biol Res*. 1991; 24(10):1041-9.

Rasia-Filho AA, Londero RG, Achaval M. Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. *Brain Res Bull*. 1999; 48(2):173-83.

Rasia-Filho AA, Londero RG, Achaval M. Functional activities of the amygdala: an overview. *J Psychiatry Neurosci*. 2000; 25(1):14-23.

Rasia-Filho AA, Fin CA, Alves M, Possa M, Roehrig C, Feoli A, Silva L, Perry ML. Glucose and lactate utilization by the amygdala of male and female rats. *Neurochem Res*. 2001; 27(12):1575-80.

Rasia-Filho AA, Fabian C, Rigotti KM, Achaval M. Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neurosci*. 2004; 126(4):839-47.

Rasia-Filho AA, Hilbig A. Papel da amígdala e do hipocampo no transtorno do estresse pós-traumático. In: Caminha R. *Transtornos do Estresse Pós-traumático*. São Paulo: Casa do Psicólogo; 2005. 37-53 p.

Rasia-Filho AA. Is there anything "autonomous" in the nervous system? *Adv Physiol Educ*. 2006; 30(1):9-12.

Rasia-Filho AA, Giovenardi M, de Almeida RM. Drugs and aggression. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2008; 3(1):40-9.

Reichlin S. Somatostatin. *N. Engl. J. Med*. 1983; 309(24):1495-501.

Ricci LA, Grimes JM, Melloni RH Jr. Lasting changes in neuronal activation patterns in select forebrain regions of aggressive, adolescent anabolic/androgenic steroid-treated hamsters. *Behav Brain Res*. 2007; 176(2):344-52.

Roberts WW, Nagel J. First-order projections activated by stimulation of hypothalamic sites eliciting attack and flight in rats. *Behav Neurosci*. 1996; 110(3):509-27.

Roeling TA, Veening JG, Kruk MR, Peters JP, Vermelis ME, Nieuwenhuys R. Efferent connections of the hypothalamic "aggression area" in the rat. *Neuroscience*. 1994; 59(4):1001-24.

Rooszendaal B, McGaugh JL. Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem.* 1996; 65(1):1-8.

Rosa CB. Efeito da microinjeção de glutamate no núcleo pósterodorsal da amígdala medial sobre o comportamento alimentar de ratos [dissertação de mestrado]. [Porto Alegre – RS – Brasil]: Universidade Federal de Ciências da Saúde Porto Alegre; 2008. 113 p.

Saha S, Henderson Z, Batten TFC. Somatostatin immunoreactivity in axon terminals in rat nucleus tractus solitarius arising from central nucleus of amygdala: coexistence with GABA and postsynaptic expression of sst2A receptor. *J Chem Neuroanat.* 2002; 24(1):1-13.

Schindler M, Humphrey PP, Emson PC. Somatostatin receptors in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 1996; 50(1):9-47.

Scott JP. Agonistic behavior of mice and rats: a review. *Am Zool.* 1966; 6(4):683-701.

Shaikh MB, Steinberg A, Siegel A. Evidence that substance P is utilized in medial amygdaloid facilitation of defensive range behavior in the cat. *Brain Res.* 1993; 625(2):283-94.

Sheehan TP, Cirrito J, Numan MJ, Numan M. Using *c-fos* immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. *Behav Neurosci.* 2000; 114(2): 337-52.

Shibasaki T, Tsumori C, Hotta M, Imaki T, Yamada K, Demura H. The response pattern of noradrenaline release to repeated stress in the hypothalamic paraventricular nucleus differs according to the form of stress in rats. *Brain Res.* 1995; 670(1):169-72.

Shindou T, Watanabe S, Yamamoto K, Nakanishi H. NMDA receptor-dependent formation of long-term potentiation in the rat medial amygdala neuron in an in vitro slice preparation. *Brain Res Bull.* 1993; 31(6):667-72.

Sloddart-Apter SL, MacDonnell MF. Septal and amygdalar efferents to the hypothalamus which facilitate hypothalamically elicited intraspecific aggression and associated hissing in the cat. An autoradiographic study. *Brain Res.* 1980; 193(1):19-32.

Siegel A. Aggression in epilepsy: animal models. In: Devinsky O, Theodore WH, editors. *Epilepsy and behavior.* New York: Wiley-Liss. 1991. 389-404 p.

Siegel A, Brutus M. Neural substrates of aggression and rage in the cat. In: Epstein AN, Morrison AR. *Progress in Psychobiology and Physiological Psychology.* 14 rd. San Diego: Academic Press CS; 1990. 135-233 p.

- Simerly R. Anatomical substrates of hypothalamic integration. In: Paxinos G. The Rat Nervous System. New York: Elsevier; 2004. 335-368 p.
- Swanson LW, Cowan WM. The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol.* 1979; 186:621-56.
- Swanson LW, Petrovich GD. What is the amygdala? *Trends Neurosci.* 1998; 21(8):323-31.
- Swanson LW. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res.* 2000; 886(1-2):113-164.
- Tang X, Yang L, Sanford LD. Interactions between brief restraint, novelty and footshock stress on subsequent sleep and EEG power in rats. *Brain Res.* 2007; 1142:110-8.
- Timo-Iaria C. In: Aires MM. *Fisiologia Básica. Comportamentos.* Rio de Janeiro: Guanabara; 1988. 163-300 p.
- Usunoff KG, Schmitt O, Itzev DE, Haas SJ, Lazarov NE, Rolfs A, Wree A. Efferent projections of the anterior and posterodorsal regions of the medial nucleus of the amygdala in the mouse. *Cells Tissues Organs.* 2009; 190(5):256-85.
- Veening JG, Coolen LM, de Jong TR, Joosten HW, de Boer SF, Koolhaas JM, Olivier B. Do similar neural systems subserve aggressive and sexual behaviour in male rats? Insights from *c-fos* and pharmacological studies. *Eur J Pharmacol.* 2005; 526(1-3):226-39.
- Veiga CP, Miczek KA, Lucion AB, de Almeida RM. Effect of 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonists injected into the prefrontal cortex on maternal aggression in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(6):825-30.
- Veinante P, Freund-Mercier M-J. Distribution of oxytocin- and vasopressin-binding sites in the rat extended amygdala: a histoautoradiographic study. *J Comp Neurol.* 1997; 383(3):305-25.
- Viana F, Hille B. Modulation of high voltage-activated calcium channels by somatostatin in acutely isolated rat amygdaloid neurons. *J Neurosci.* 1996; 16(19), 6000-11.
- Viollet C, Lepousez G, Loudes C, Videau C, Simon A, Epelbaum J. Somatostatinergic systems in brain: networks and functions. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 286(1-2):75-87.
- Vochtelloo JD, Koolhaas JM. Medial amygdala lesions in male rats reduce aggressive behavior: interference with experience. *Physiol Behav.* 1987; 41(2):99-102.



Watanabe Y, Ikegaya Y, Saito H, Abe K. Roles of GABA, NMDA and muscarinic receptors in induction of long-term potentiation in the medial and lateral amygdala in vitro. *Neurosci Res.* 1995; 21(4):317-22.

Watson RE Jr, Edinger HM, Siegel A. A [<sup>14</sup>C]2-deoxyglucose analysis of the functional neural pathways of the limbic forebrain in the rat. III. The hippocampal formation. *Brain Res.* 1983; 286(2):133-76.

Westberry JM. Categorization of pheromonal chemosignals by medial amygdala. [Tese de doutorado]. [Florida – EUA]: Florida State University College of Arts and Sciences; 2003.

Wilson MA, Mascagni F, McDonald AJ. Sex differences in delta opioid receptor immunoreactivity in rat medial amygdala. *Neurosci Lett.* 2002; 328(2):160-4.

Wong M, Chen Y, Moss R.L. Excitatory and inhibitory synaptic processing in the accessory olfactory system of the female rat. *Neuroscience.* 1993; 56(2):355-65.

Wongwitdecha N, Marsden CA. Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. *Behav Brain Res.* 1996; 75(1-2):27-32.

Wood RL, Newman SW. Hormonal influence on neurons of the mating behavior pathway in male hamster. In: Micivych PE, Hammer Jr RP. *Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones.* New York. 1995. 3-39 p.

## 2. OBJETIVOS

Desenvolver e validar um modelo experimental de indução de comportamento agressivo em ratos machos adultos *Wistar*.

Elucidar a participação da MePD na modulação do comportamento agressivo por meio da técnica de marcação neuronal pela ativação da expressão da proteína Fos.

Analisar o efeito da microinjeção da somatostatina na MePD na modulação do comportamento agressivo de machos.

To be submitted to BMC Neuroscience

## **THE ADULT MALE RAT POSTERODORSAL MEDIAL AMYGDALA IS INVOLVED WITH BOTH STRESSFUL RESPONSES AND SPECIFIC AGGRESSIVE DISPLAY**

Daniela Haas<sup>1</sup>, Franklin Panato Back<sup>2</sup>, Gabriel N. S. Pires<sup>2</sup>, Eloisa Pavesi<sup>3</sup>, Elisa Winkelmann Duarte<sup>4</sup>, Márcia Giovenardi<sup>2</sup>, and Alberto A. Rasia-Filho<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate in Pathology (Experimental Neuroscience Research Program), Federal University Foundation of Health Sciences Porto Alegre, 245 Sarmiento Leite St, Porto Alegre 90170-050 RS, Brazil

<sup>2</sup>Department of Basic Sciences, Federal University Foundation of Health Sciences Porto Alegre, 245 Sarmiento Leite St, Porto Alegre 90170-050 RS, Brazil

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Federal University of Santa Catarina, University Campus – Trindade, Florianópolis 88040-900 SC, Brazil

<sup>4</sup>Department of Morphological Sciences, Federal University of Santa Catarina, University Campus – Trindade, Florianópolis 88040-900 SC, Brazil

\*Correspondence to: Prof. A.A. Rasia-Filho, UFCSPA, 245 Sarmiento Leite St, Porto Alegre 90170-050 RS, Brazil. Fax. + 55 51 33035982. E-mail address: rasiafilho@pq.cnpq.br.

**Abstract**

The posterodorsal medial amygdala (MePD) is part of the extended amygdala and is a nodal point in the social behavior neural network of rats. Previous data showed that lesions in the rat's medial amygdala decrease aggressive display in rats, although the role of the MePD needs further study. However, adult *Wistar* male rats maintained under standard laboratory conditions seldom show aggression when compared to wild rats. In the present study, we describe a reliable aggressive display that can be set about by joining different procedures: isolation in a home cage for a short period of time, gentle manual restraint during 1 (one) minute, and the presentation of an intruder into the resident's cage. The MePD presented a higher Fos-immunoreactivity (Fos-ir) following restraint and an aggressive encounter with an intruder compared to a the "control" group ( $P < 0.05$ ), with no medial or lateral clusters within this area or hemispheric laterality effect ( $P > 0.05$ ). However, Fos-ir in the MePD was also significantly increased after 1-min of restraint, a mild stressful stimulus, compared to animals that were only maintained isolated ( $P < 0.05$ ). Then, an additional stereotaxic study revealed that the MePD microinjection of a single and unilateral dose of somatostatin (1  $\mu$ M/0.3  $\mu$ l), which is inhibitory to local neurons, reduced drastically the occurrence of aggressive attacks towards an intruder when compared to the control data ( $P < 0.05$ ). The present description adds to the current animal models to that study aggression, now being reliably induced in "domesticated" *Wistar* rats, and to the comprehension of the role of the MePD on the neural processing of stressful responses and specific aggressive display.

**Keywords:** extended amygdala, aggression, agonistic behavior, Fos expression, somatostatin, rat.

## 1. Introduction

The rat's amygdala, which is not an homogeneous structural or functional unit, has been reported as having a relevant role in emotional, neuroendocrine and behavioral responses [1,2,3]. Several lines of evidence indicate that the different amygdaloid nuclei are critically involved in various social behaviors such as fear, anxiety, stress responses, as well as in the consolidation of aversive memories [4,5,6,7,8]. Stimulation of certain amygdaloid nuclei differently affects both defensive rage and predatory attack behavior in cats. I.e., stimulations of the anterior, basomedial, and the medial amygdaloid (MeA) nuclei facilitate defensive rage behavior, whereas the central and lateral nuclei suppress it; the opposite effects occur for the predatory attack behavior [9,10]. The MeA, the largest nucleus of the extended amygdala in the ventral forebrain [11], integrates neural pathways coming from the olfactory/vomeronasal pathways, and connects to different hypothalamic nuclei in order to modulate reproduction and agonistic behaviors [12,13,14,15,16,17].

Lesions in the whole MeA decrease aggressive display in rats. Notably, the rat posterodorsal subnucleus of the MeA (MePD) has efferent pathways that are involved with specific hypothalamic neuroendocrine and sympathetic/parasympathetic-related parts functionally integrated for behavioral outcomes [15,18,19]. Neuroanatomical data suggest that the MePD can be part of a neural circuitry formed by reciprocally interconnected areas for the regulation of defensive/aggressive responses [8], which fits well with a brain organizational model proposed by Newman [13]. Accordingly, "data from studies employing a wide variety of paradigms, including discrete lesions, electrical stimulation, localized hormonal or neuropharmacological manipulations, and immediate early gene expression, have led... to implicate a common group of limbic areas, including nuclear groups in the medial extended amygdala, the lateral septum,

the medial preoptic area, the anterior hypothalamus, the ventromedial nucleus and adjacent ventrolateral hypothalamus, and the midbrain periaqueductal gray and adjacent tegmentum. Together these brain areas influence not only male and female sexual behavior and maternal behavior, but also the reproductive-related behaviors, such as territorial marking, territorial aggression, and maternal aggression. It is not an action produced by the on or off state of any one of the nodes..., but a sequence of multiple behaviors... that is initiated by and emerges from a temporal pattern, and therefore a dynamic pattern, of activity across the network” [13].

It is relevant to detail the involvement of some brain areas involved in behavioral display, which can indicate the existence of subregion- and network-specific roles for experience-related plasticity in the evaluation of complex perceptual clues, behavioral display and adaptive responses. Here we present the development of other protocol to induce aggressive behavior in “domesticated” adult *Wistar* male rats. This strain of animals maintained under standard laboratory conditions seldom show aggression when compared to wild *Rattus norvegicus* [19,20]. As will be described below, reliable aggressive displays were set about by joining different procedures: isolation in a home cage for a short time, gentle manual restraint during 1 minute, and the presentation of an intruder into the resident’s cage. Behavioral data clearly indicates that males are instigated to fight against another rat under these conditions. However, the MePD presented a higher Fos-immunoreactivity (Fos-ir) after both restraint as mild stressful stimulus or following restraint and an aggressive encounter with an intruder. A further study revealed that the MePD microinjection of a single dose of somatostatin, which is inhibitory to local neurons, reduced drastically the occurrence of aggressive attacks towards the intruder. Data will be discussed in the light of a model to induce

aggression in laboratory rats and the functional role of the MePD in specific behavior displays.

## **2. Materials and Method**

### **2.1. Animals**

Adult male *Wistar* rats (90 days-old, approximately 280 grams of body weight, n = 30) were reared in groups under standard laboratory conditions, with free access to food and water, room temperature around 22°C and a 12h light/dark cycle (lights off at 5 p.m.). Each of these males was called a “resident” when, soon afterwards, was kept individually in a transparent acrylic own home cage (46 x 31 x 17 cm). The saw dust was cleaned once a week to ensure the presence of odors in the resident’s home cages. In order to test aggressive displays of these resident rats, younger adult *Wistar* males (70 days-old, around 220 grams of body weight, n = 85) were maintained under the same laboratory conditions and were called “intruders”. The intruders were used just once. No bleedings, cruelty or attacks that caused injuries occurred towards the intruder in any experimental moment; otherwise, the tests would have been finished immediately. All efforts were made to minimize the number of animals studied and their suffering and this research was approved by our local Ethical Committee (protocol number 358/07). In addition, all rats were manipulated according to international laws for the ethical care and use of laboratory animals (European Communities Council Directive of November 1986, 86/609/EEC)

## **2.2. Experimental Procedure**

### **2.2.1. Induction of aggressive behavior display in resident males**

The induction of aggressive behavior display in normally non-responsive *Wistar* adult male rats born and bred under standard laboratory condition was achieved by joining different procedures in a fixed protocol sequence: isolation of the rat in its home cage, gentle manual restraint of the rat during 1 minute in the day of the experiment and, immediately afterwards, the presentation of an intruder into the resident's cage. All aggressive behavior tests were performed at night (6 – 8 p.m.) under dim red light. Pilot studies guided the present procedure and will be mentioned briefly for a matter of conciseness whenever necessary; otherwise, those improvements that led to consistent results will be depicted here.

To develop the present protocol, in the first step the resident males were divided into 3 groups ( $n = 5$ ) according to the following: (1) “control”, which represents rats that were kept just isolated for 14 days after beginning of the experiment (day 0 corresponds to the first day that the rats were placed individually) and submitted to no other experimental manipulation; (2 and 3) “restraint” and “fight” groups, which represents rats that were maintained isolated in their home cages, were submitted to restraint and, then, were presented to an intruder on the experimental days (ED) 7 and 9, when the resident male was removed from its home cage, gently restrained manually during 1 min, and left moving free for additional 9 min in its original cage. The intruder male was placed in the resident's cage 9 min afterwards and the videotaping recordings of aggressive behavior display began at this moment and lasted 10 min. On ED 14, the “restraint” group was submitted to the same procedures as done on EDs 7 and 9, but the presentation of the intruder was avoided. The “fight” group was submitted to the same



procedures as done on EDs 7 and 9, including fight with the intruder along 15 min. Besides the procedures on EDs 7 and 9, this additional aggressive experience on ED 14 served to enhance the reliability of fighting display. I.e., the additional ED 14 and the extension of the testing period to 15 min were based on pilot studies that showed that males display a more reliable aggressive behavior using this last approach (data not shown). In contrast, age-matched male rats reared in groups under laboratory conditions did not exhibit repetitive and/or intense aggressive behavior among themselves in the same cage [20; Giovenardi, M., personal observation).

The behaviors recorded during the tests of aggression were: social investigation (the resident approached the intruder and sniffed its body and/or genitals); attack (the resident moved laterally or frontally orientated towards the back of the intruder, usually in association with piloerection; immobilization (the resident put its body over the intruder and maintained an immobile position during at least 3 seconds); “resting” (when no obvious offensive or defensive motor action was occurring); deambulation (the resident moves across the cage, aiming or not to pursue, reach the intruder and was taken as an index of locomotion) [21]. Both frequency and duration (in seconds) of these parameters were recorded as they were previously validated as behavioral indexes related with aggression in rats [21]. These behavioral parameters were analyzed using the Noldus® system software (Noldus Information Technology, The Netherlands). Animals in the third experimental group (“fight” group) presented notable aggressive behavior on ED 14, which was the experimental requirement for this group prior to test the Fos expression in the MePD. Then, the experimental design was developed to compare these males to isolated ones not manipulated along the other EDs (first and “control” group) and to those submitted to restraint but not to the intruder presence on the ED 14 (“restraint” group).

### **2.2.2 Immunohistochemistry of the expression of Fos immunoreactivity**

Animals from the 3 experimental groups were studied for the detection of Fos protein in the MePD. All rats were killed at 8 p.m. of the ED 14. The “control” group was not disturbed until the beginning of this experimental step. The other two groups were submitted to 1-min of restraint but only the last group also experienced a last fight session. Basically at the same time, the rats were deeply anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg, i.p.) and were transcardially perfused with saline (100 ml) followed by 4% paraformaldehyde diluted in phosphate buffered saline (PBS, 0.1 M, pH 7.3, 200 ml). This occurred 90 minutes after the beginning of the experiment for the groups “restraint” and “fight”. The brains were removed and remained in the same fixative solution overnight at room temperature. Cryoprotection was obtained storing the brains in a 30% sucrose solution at 4°C. Then, the brains were coronally sectioned using a vibratome (50  $\mu$  m-thick, Leica, Germany), slices were coded and maintained immersed in a anti-freezing solution (PBS, sucrose, and propilenoglicol; Vetec, Brazil) and stored in freezer at -70°C until the day of Fos immunodetection.

The Fos protein immunocytochemistry was carried out using the avidin-biotin-peroxidase method as previously described [22]. Free-floating brain sections were washed (3 times, 10 minutes each) in PBS and incubated in PBS, Triton X-100 (Sigma Chemicals Co., USA), goat serum and anti-Fos antiserum raised in rabbit (Ab-5; Calbiochem, USA) at a dilution of 1:20.000 for 24 h at 4° C and continuous shaking. Afterwards, sections were incubated for 90 min at room temperature in a solution 1:200 of biotinylated goat antirabbit IgG (Vector Laboratories, USA), and then placed in the a mixed avidin–biotin horseradish peroxidase complex solution 1:200 (ABC Elite Kit; Vector Laboratories, USA) for the same period of time. The peroxidase complex

was visualized by a 10 minute-exposure to a chromogen solution containing 0.02% 3,30-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Chemicals Company, USA) with 0.3% nickel ammonium sulfate in 0.05 m Tris-buffer (pH 7.6), followed by incubation for 5 min in chromogen solution with glucose oxidase (Glucose Oxidase Type VII from *Aspergillus Niger*, 0.01%, Sigma Chemicals Company, USA) and 10% p-D-glucose (Sigma Chemicals Company, Saint Louis, USA) to produce a blue-black product. To control the enzymatic activity, some random sections were processed but had the omission of the primary antiserum. This provided no detectable Fos-immunostaining and an identical “negative” background aspect (data not shown). Afterwards, sections were rinsed in PBS, dehydrated in ethanol, cleared with xylene and covered with DPX (distyrene/plasticizer/xylene) synthetic balsam and coverslips. All experimental groups were processed together at the same time to avoid possible unspecific variations in the procedures and their results [23,24,25].

### **2.2.3. Quantification procedure**

Microscopical images of each brain slice were compared with the schematic drawings of an atlas [26]. The MePD was found in both hemispheres flanked laterally by the optic tract and the “molecular layer” (a cell-sparse rim close to the ultimate medial border of the MePD) and ventrally by the stria terminalis (Figure 1) [11].

Quantification of the number of Fos immunomarked cells within the MePD was done according to an adaptation of the procedure previously published by Newman and colleagues [27,28,29,30]. The criteria for the identification and counts of Fos-ir cells were: a) be within the including borders of the “area of interest” AOI rectangle; b) have a staining color contrasting to the background; and, c) have identifiable nuclear

cell borders (Figure 1). All microscopic images lighting and contrast conditions were maintained identical during the experimental data acquisition.

For every animal, 3 sections undoubtedly containing the left and the right MePD were chosen between 2.76 to 3.36 mm posterior to the bregma (Paxinos and Watson, 1998). For every animal, the MePD Fos-ir cells were drawn by two observers blind to the experimental conditions using a camera lucida attached to an optic microscope (200 x; Olympus BX-41, Japan). The coincidence in the number of Fos-ir cells counted by the two observers was near 97%. Over schematic drawings of the microscopic images, it was overlaid an AOI rectangle with two borders for inclusion and exclusion for cell counts in the middle of the MePD. Each AOI rectangle corresponded to 0.136 mm<sup>2</sup> [31]. A previous pilot study showed that animals that composed the third experimental group appeared to have more Fos-ir cells in the MePD than the animals in the “control” group (data not shown). Then, for this specific group that was submitted to an aggression test in the day of study for Fos expression, 2 adjacent AOI rectangles were put on the medial and the lateral MePD, respectively. The size and position of each AOI are presented in Figure 1. The intention was to look clusters of Fos-ir cells in these specific subregions of the MePD, as occurred for other behavioral displays [32]. As an “internal” and additional control for this experiment, the ventrolateral part of the ventromedial hypothalamus, previously described as critically involved with aggressive, attack behavior was also studied for Fos expression in the present model [33]. This hypothalamic area served to compare with the specificity of Fos-ir in the MePD and showed reliable Fos-ir cells in the both “fight” and “restraint” groups, but not in the “control” group (data not shown).

Data fulfilled the requirements for the use of a parametric statistic test. Counts of Fos-ir cells obtained in the third experimental group, submitted to the intruder

exposure and that displayed aggressive behavior, were compared for the effects of MePD subregion location (medial or lateral), hemispheric laterality, and the interaction of these factors using a repeated-measures analysis of variance (ANOVA) test. As will be described in results and in Figure 3, no effect of subregion location of Fos-ir in the MePD was found. Therefore, data from the medial and lateral MePD were pooled together for all experimental groups. Cell counts obtained were averaged to form data points corresponding to the mean values of the 2 observers and the 3 brain sections studied/per hemispheric side. That is, each rat of the group “fight” generated one data point for the right MePD that was paired with another one for the left MePD. These counts of Fos-ir cells were compared by an one-way ANOVA test followed by the Tukey test. The statistical significant level was set *a priori* as  $p \leq 0.05$ .

### **2.3. Stereotaxic microinjection**

Due to the fact that rats in the “restraint” and in the “fight” groups showed similar higher amounts of Fos-ir cells in the MePD (but no effect of laterality, as will be described in Results), another set of experiments were run. I.e., it appeared that the MePD could show a higher Fos immunodetection following both a mild stressful condition of restraint or due to an aggressive encounter. The rat MePD can respond to these two different stimuli [16,34]. To further advance the possibility of the MePD be involved with the modulation of an aggressive display, it was unilaterally microinjected somatostatin directly into the MePD. This neuropeptide has marked local inhibitory actions [35,36,37,38,39,40] and it was initially hypothesized that it could reduce the aggressive behavior of males submitted to the aforementioned protocol that induced higher levels of aggression.

Fifteen adult male *Wistar* rats were maintained under the same standard laboratory conditions as depicted above. They were also submitted to isolation and the aggressive experience towards an intruder on EDs 7 and 9, as described above. These two aggressive behavior recordings prior to the stereotaxic surgery generated aggressive behavior data that were pooled together and provided control data for further comparisons of the microinjection results. On ED 10, males were anesthetized with ketamine and xylazine (90 mg/kg and 10 mg/kg, i.p., respectively) and stereotaxically implanted with an unilateral cannula (0.6 mm of outer diameter, OD) aiming 2 mm above the right MePD. This hemisphere was chosen based on the lack of a laterality effect on the Fos expression, as revealed here, and on previous data that demonstrated marked behavioral, anxiogenic, and cardiovascular responses promoted by the right MePD [25,41,42]. Stereotaxic coordinates were: 3.4 mm posterior to the bregma, 3.6 mm lateral to the sagittal suture, and 5.9 mm below the dura-mater.

Four days after the surgery (ED 14), and with animals displaying an apparent normal motor, feeding and drinking behavior, rats were randomly assigned to receive one of the following MePD microinjections: saline (0.3  $\mu$ l, n = 9) or somatostatin (1  $\mu$ M/0.3  $\mu$ l; Sigma Chemicals Co., USA; n = 6). Because the occurrence of the aggressive behavior was considered high for a male *Wistar* rat under the present protocol, it was assumed that even higher results might not be consistently found to reach statistical difference, no excitatory substance was microinjected to avoid misleading results due to a “roof effect” in the data and/or could cause serious hazard to the intruder and be ethically questionable. On the other hand, it was not our intention to establish a dose x effect curve for somatostatin microinjected in the MePD. Rather, we would like to show that chemical inhibition of the MePD could decrease the aggressive display, aiming to advance the interpretation of the MePD role on aggression and the

Fos-ir previously found in the same conditions. The dose of somatostatin was specifically chosen based on previous results that showed clear inhibitory actions using various experimental approaches and in different brain areas [36,37,38,39], including the MeA [40]. Microinjections in the MePD were done while gently manual restraining the rat to ensure that animals in the studied groups were not experiencing undue stress or discomfort. No obvious alterations in behavior were noted. The displacement of liquid and an air bubble inside the catheter connecting a Hamilton microsyringe (5  $\mu$  l) to the intracerebral cannula was used to monitor the microinjection. The microinjection lasted for 1 minute and the needle remained inside the cannula for an additional minute to avoid reflux [42]. Before and after this procedure, each rat was placed in its individual cage. After 8 minutes, an intruder was introduced in the resident's cage and the same aggressive behavior parameters described above were recorded during 15 minutes. To ensure that the effect of the vehicle or the somatostatin MePD microinjection would lead to prolonged modification in the rat aggressive display, another test was done 24 h afterwards, i.e., on ED 15, each resident was faced with another intruder and their behaviors were recorded for 10 min, but no animal was microinjected in this specific day. Therefore, at the end of the experiment, behavioral records for 3 experimental moments were available for comparisons between groups: the control pre-microinjection data, the results in the microinjection day, and the one-day post-microinjection values.

Later in the same ED 15, rats were deeply anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg, i.p.) and transcardially perfused with 9% saline and 10% formalin solution. Brains were removed, sectioned 60  $\mu$  m-thick in a vibratome (Leica Vibratome 1000), stained with hematoxylin-eosin, and the exact location of the microinjection was compared to an atlas [26]. Only those rats that had the microinjections directed to the

MePD were considered for further analysis of their data (Figure 4, A). Results obtained from misplaced microinjections, from brains with signals of intraparenchymatous hemorrhage or that showed evident mechanical lesions of the MePD or the stria terminalis were discharged from the final data of the four experimental groups. The diffusion rate of microinjected substances into the MePD were not directly evaluated in present study. However, it is likely that drugs affected mainly the intended area as previously discussed elsewhere [25,42]. In addition, animals in which the cannula was placed in the vicinity of the MePD composed an additional “non-target” group to control for the spread of the drugs and their effects in the adjacent amygdaloid nuclei, basal ganglia or internal capsule. Their data did not reproduce the effects obtained with the MePD microinjection of somatostatin (data not shown).

To achieve the underlying assumptions of data normality and homogeneity of variance, data regarding the frequency and duration of the behavior parameters recorded were transformed using the weighted least squares method. Values were then compared between groups (saline or somatostatin microinjected in the MePD), experimental conditions (control pre-microinjection, microinjection *per se*, and post-microinjection recordings), and the interaction of these factors by a two-way ANOVA for repeated measures and the Fisher LSD (Least Significant Difference) *post hoc* test. The statistical significant level was also set *a priori* as  $p \leq 0.05$ .

### **3. Results**

Animals submitted to restraint and exposition to an intruder showed notable aggressive behavior display, as depicted in the microinjection experiment data below (Figure 4 and Table 1). As a rule, after a short latency, the intruder was attacked rapidly



and the resident showed various aggressive postures. The intruder usually demonstrated submission by the resident male. Attempts to copulate with the intruder were not observed unless the occurrence of some mounts with pelvic thrusting movements at the side of the body of the defeated rat.

### 3.1. Fos expression

The microscopic observation of Fos-ir cells in the MePD revealed their presence in the 3 experimental groups studied here (Figure 2). The number of these cells was seldom abundant in rats that were submitted only to isolation, whereas Fos-ir cells appeared widely and homogeneously distributed in the MePD of males composing the groups “restraint” and “fight”.

When comparing the Fos-ir counts obtained from the MePD medial and lateral aspects and in both right and left hemispheres specifically from the third experimental group submitted to an aggressive encounter on the day of study, no statistically significant difference was found for the effect of subregion [ $F(1,8) = 1.10$ ;  $p = 0.32$ ], laterality [ $F(1,8) = 0.01$ ;  $p = 0.9$ ] or the interaction between these two factors [ $F(1,8) = 1.80$ ;  $p = 0.21$ ; Figure 3].

On the other hand, counts of Fos-ir pooling the MePD medial and lateral subregions data for the 3 experimental groups showed that there was a statistically significant difference among groups [ $F(2,12) = 5.37$ ;  $p = 0.02$ ], but not for laterality [ $F(1,12) = 0.26$ ;  $p = 0.61$ ] or the interaction between these factors [ $F(2,12) = 0.09$ ;  $p = 0.91$ ]. Because groups are different among themselves independently of the hemisphere studied, the *post hoc* test was employed comparing the results of the right and left MePD pooled together. The Tukey test revealed that the “control” group submitted only

to isolation showed the lowest counts in the MePD compared to other two groups ( $p < 0.05$ ). Rats submitted to isolation and just restraint on ED 14 and those others that were isolated, restrained, and that experienced 15-min of an aggressive encounter with the intruder showed similar higher Fos-ir cells counts ( $p > 0.05$ ; Figure 3).

### **3.2. Somatostatin microinjection**

Regarding the stereotaxic microinjection experiment, isolation and restraint generated reliable aggressive behavior display. Data are depicted in Figure 4. This can be evidenced by the frequency of attacks compared to “control” group (saline) males. This aggressive outcome could be found on EDs 7 and 9 and, for those rats that composed the last experimental group, also on ED 14. These values formed baseline values to compare with the data obtained following MePD microinjection of saline or somatostatin.

There was a statistically significant difference when compared these two experimental groups on the day of microinjection for the attack behavior [ $F(29,4) = 3,23$ ;  $P = 0,01$ ]. The Fisher LSD *post hoc* test showed that, compared to the saline “control” group, animals microinjected with somatostatin showed a statistically significant reduction in the attack aggressive behavior (Figure 4,  $P < 0.05$ ). Somatostatin microinjected in the MePD also decreased the occurrence of immobilization behavior when compared to the pre-microinjection control recordings. One day after microinjection these aforementioned behaviors were similar to pre-microinjection values and were not statistically different ( $P > 0.05$ ) (Figure 4, B). Saline did not promote any significant difference compared to pre-microinjection or

post-microinjection data ( $P > 0.05$ ) (Figure 4, C and D). The deambulation behavior was not affected in both saline or somatostatin microinjected rats ( $P > 0.05$ ) (Table 1).

#### 4. Discussion

Results indicate that previously naive, male *Wistar* rats reared under standard laboratory conditions can display aggressive behavior when isolated, gently manual restrained, and presented to an intruder into the resident's cage. This is a simple and reliable method that can provide other experimental approach to test the neurophysiological basis and the pharmacological modulation of aggressive display. In addition, the present results suggest that the MePD can be involved with the neural modulation of stressful stimuli and the aggressive behavior [8,20,43,44]. In rats submitted to isolation, restraint, and experienced a last aggressive session test, the expression of protein Fos-ir in the MePD showed neither specific clusters within this brain area nor effect of hemispheric laterality. The aggressive display in rats submitted to this protocol could be reduced by a single and unilateral microinjection of somatostatin in the MePD, without affecting motor activity. These are novel data for the MePD participation in the aggressive outcome and some methodological comments will be presented to address this issue.

The expression of Fos protein was considered during years as a cellular marker for neuronal activation [45]. Different experimental paradigms were employed using the c-fos or Fos immunodetection to propose which brain areas would be involved with the processing of sensorial information or behavioral occurrence [13,32,45,46]. Because of the time needed to reach maximal expression [22], the absence of Fos in certain brain area would not necessarily imply that it was not participating in a neural

circuit. It is conceivable that no detectable Fos-ir would indicate that, at that specific time, the studied area might still not be engaged in the task in a hierarchical or parallel circuit for neural processing. But, here, it is noteworthy that males submitted to isolation and restraint showed similar Fos-ir cells counts than rats that were additionally allowed to exhibit aggressive behavior against an intruder. This can mean that the MePD is responding to both a mild stress and/or conditioned learning but also can be involved with the modulation of aggressive behavior.

Restraint serves as an animal model of stressful stimulus and for the induction of stress-related neuroendocrine response. The MeA subnuclei are affected by adrenal steroids released in stressful situations [47,48], display GC receptors mRNA-containing cells, GC receptor immunoreactivity [49] and CRH receptor mRNA [50]. Further data indicated that restraint stress increased the number of Fos-immunoreactive neurons in the MeA at the same time that enhanced blood pressure [51]. Accordingly, MeA neurons presented proportional increases in the activity and the presence of Fos protein in response to acute 15, 30 or 60 min periods of restraint [52]. Recently, it was reported that acute restraint stress for 1 h on one single day reduced the MePD dendritic spine density, a finding not found with single 6 h of restraint or repeated chronic (6 h daily along 28 days) restraint stress [8]. Immobilization stress also caused a marked MeA release of substance P, a neurotransmitter/neuromodulator relevant for the processing of emotional states, implicating this nucleus with the processing of stressful stimuli and with stress-related disorders [53,54]. These findings can adjoin to the present finding of Fos-ir in the MePD of 1-min restrained rats and reinforce the role of the MePD on the processing of stressful stimuli [8]. Moreover, because the whole MeA was previously associated with the consolidation of aversive memories [48], it is possible that the repetition of restraint followed by placing an intruder into the resident's cage can lead to

a kind of associative, conditioning response, as observed in rats in the “fight” group on ED 14, which also caused the expression of Fos in MePD in the “restraint” group.

Nevertheless, plasmatic levels of corticosterone exerted a positive feedback control over brain mechanisms involved in aggressive behavior, which lead to the suggestion that stress hormones would facilitate the display of aggression [55]. Isolation and restraint can be increasing stress-related hormonal increases prior to the confrontation with an intruder, which elicits a series of different stimuli in the resident male to defeat the intruding rival. The behavioral repertoire of fighting is composed of sequential bursts of typical displays, with the resident showing offensive ones and the intruder presenting defensive acts and aggressive postures [16,56,57]. Fos-ir was consistently found in the MePD following the display of aggressive behavior in rats, although this result alone would not prove that the MePD is involved with aggression. Somatostatin microinjected in the MePD was able to reduce the occurrence of the attack behavior of resident rats without altering locomotion, as assessed in the same experiment. Then, altogether, it is suggested that the MePD can be involved with the modulation of aggression as well. Indeed, the anterodorsal MeA (MeAD) receives olfactory information and, after determining its social relevance, sends them to the MePD via amygdaloid intercalated nuclei [58]. The MePD can be functionally relevant in offensive contexts and in maternal aggression [17,43,59], but not to defensive reactions against a natural predator [60]. Present data add to this concept and to the neural network model for social behavior modulation proposed before by Newman [13].

As observed in several species, males are distinctly more aggressive than females, which addressed studies of the effects of gonadal hormones on aggressive behavior [61]. Testosterone receptors are located in neurons from brain areas involved

with aggression display [62]. There is a high concentration of neurons expressing androgen receptors [62] and various effects of gonadal hormones and/or sexual dimorphisms in the MePD of rats [63,64,65]. With the same resident-intruder paradigm or with the presentation of a receptive female, it was revealed that the medial, but not the lateral, part of the MePD showed Fos-ir following aggression or sexual behavior in Wild-type Brown Norway male rats [20]. The caudal part of the MePD also showed marked Fos-ir after aggressive or sexual encounters [20]. Future efforts can demonstrate if the Fos expression related with the aggressive behavior outcome in males occurs in the same MePD neuronal subpopulation that possess androgen receptors. Additionally, it will be interesting to look for the consequences of MePD neuronal activation on neuroendocrine secretion and/or other mnemonic, social behavior or adaptive modulatory systems evoked by an aggressive experience. In effect, activation of GC receptors in the MeA would be important for the formation of memory for aversive learning in rats [7]. And, at least for the amygdaloid basolateral complex, suppression of inhibition in projection neurons are crucial for the emergence of negative emotional responses, including exaggerated fear and anxiety in stressed rats [66]. It is expected that some of these animal models and experimental data can contribute to reveal the normal and abnormal aggression occurrence not only in rats but also in humans, for which the amygdaloid function is relevant [16].

### **Acknowledgements**

Authors are grateful to Ms. Nathalie L. F. Sandi for her contribution to the initial development of the present protocol and to Dr. Léder L. Xavier (PUCRS, Brazil) for his critical comments on the Fos quantification. Supported by Brazilian Granting Agencies CAPES and CNPq. ARRF is a CNPq researcher.

## References

- [1] M. Davis: **Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear potentiated startle.** *Am Psychol* 2006, **61**:741–756.
- [2] Rasia-Filho AA, Londero RG, Achaval M: **Functional activities of the amygdala: an overview.** *J Psychiatry Neurosci* 2000, **25**:14-23.
- [3] Swanson LW, Petrovich GD: **What is the amygdala?** *Trends Neurosci* 1998, **21**:323-331.
- [4] Adamec RE, McKay D: **Amygdala kindling, anxiety, and corticotrophin releasing factor (CRF).** *Physiol Behav* 1993, **54**:423–431.
- [5] Carter RN, Pinnock SB, Herbert J: **Does the amygdala modulate adaptation to repeated stress?** *Neuroscience* 2004, **126**:9–19.
- [6] David JT, Cervantes MC, Trosky KA, Salinas JA, Delville Y: **A neural network underlying individual differences in emotion and aggression in male golden hamsters.** *Neuroscience* 2004, **126**:567-578.
- [7] Roozendaal B, McGaugh JL: **Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task.** *Neurobiol Learn Mem* 1996, **65**: 1–8.
- [8] Marcuzzo S, Dall'oglio A, Ribeiro MF, Achaval M, Rasia-Filho AA: **Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats.** *Neurosci Lett* 2007, **424**:16-21.
- [9] Smith DA, Flynn JP: **Afferent projections to affective attack sites in cat hypothalamus.** *Brain Res* 1980, **194**:41-51.
- [10] Shaikh MB, Siegel A: **Neuroanatomical and neurochemical mechanisms underlying amygdaloid control of defensive rage behavior in the cat.** *Braz J Med Biol Res* 1994, **27**:2759-2779.
- [11] de Olmos J, Beltramino CA, Alheid G: **Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey.** In: *The Rat Nervous System*. Edited by Paxinos G. San Diego: Academic Press; 2004:509–603.
- [12] Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW: **Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat.** *J Comp Neurol* 1995, **360**:213–245.
- [13] Newman SW: **The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network.** *Ann NY Acad Sci* 1999, **877**:242–257.
- [14] Meredith M, Westberry JM: **Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones.** *J Neurosci* 2004, **24**:5719–5725.
- [15] Choi GB, Dong H-W, Murphy AJ, et al: **Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus.** *Neuron* 2005, **46**:647-660.
- [16] Rasia-Filho AA, Giovenardi M, de Almeida RM: **Drugs and aggression.** *Recent Pat CNS Drug Discov* 2008, **3**:40-49.

- [17] Nelson RJ, Trainor BC: **Neural mechanisms of aggression**. *Nature* 2007, **8**:536-546.
- [18] Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW: **Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems**. *Brain Res Rev* 2001, **38**:247-289.
- [19] De Almeida RM, Lucion AB: **Role of the intruder in the aggressive behavior of colonies of wild rats (*Rattus norvegicus*)**. In: *Animal Model in Psychopharmacology*. Edited by Olivier B. Verlag; 1991:347-356.
- [20] Veening JG, Coolen LM, de Jong TR, Joosten HW, de Boer SF, Koolhaas JM, Olivier B: **Do similar neural systems subservise aggressive and sexual behaviour in male rats? Insights from c-fos and pharmacological studies**. *Eur J Pharmacol* 2005, **526**:226-239.
- [21] Blanchard RJ, Wall PM, Blanchard DC: **Problems in the study of rodent aggression**. *Horm Behav* 2003, **44**:161-170.
- [22] Cezario AF, Ribeiro-Barbosa ER, Baldo MV, Canteras NS: **Hypothalamic sites responding to predator threats - the role of the dorsal preammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior**. *Eur J Neurosci* 2008, **28**:1003-1015.
- [23] Rasia-Filho AA, Xavier LL, dos Santos P, Gehlen G, Achaval M: **Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats**. *Brain Res Bull* 2002, **58**:67-75.
- [24] Martinez FG, Peyré-Tartaruga LA, Hermel EES, Xavier LL, Rasia-Filho AA, Achaval M: **Intermediate filament expression in the medial amygdala subnuclei during postnatal development of male and female rats**. In: *Proceedings of the 5th Forum of the Federation of European Neuroscience Societies: 2006: Viena: FENS Abstracts; 2006:A155.6*.
- [25] de Castilhos J, Rigon P, Xavier LL, Rasia-Filho AA, Achaval M: **Sex differences in NADPH-diaphorase activity in the rat posterodorsal medial amygdala**. *Brain Res* 2009 DOI 19815007.
- [26] Paxinos G, Watson C: *The Rat Brain Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press; 1998.
- [27] Kollack SS, Newman SW: **Mating behavior induces selective expression of Fos protein within the chemosensory pathways of the male Syrian hamster brain**. *Neurosci Lett* 1992, **143**:223-228.
- [28] Kollack-Walker S, Newman SW: **Mating and agonistic behavior produce different patterns of Fos immunolabeling in the Syrian hamster brain**. *Neuroscience* 1995, **66**:721-736.
- [29] Kollack-Walker S, Newman SW: **Mating-induced expression of c-fos in the male Syrian hamster brain: role of experience, pheromones, and ejaculations**. *J Neurobiol* 1997, **32**:481-501.
- [30] Parfitt DB, Newman SW: **Fos-immunoreactivity within the extended amygdala is correlated with the onset of sexual satiety**. *Horm Behav* 1998, **34**:17-29.

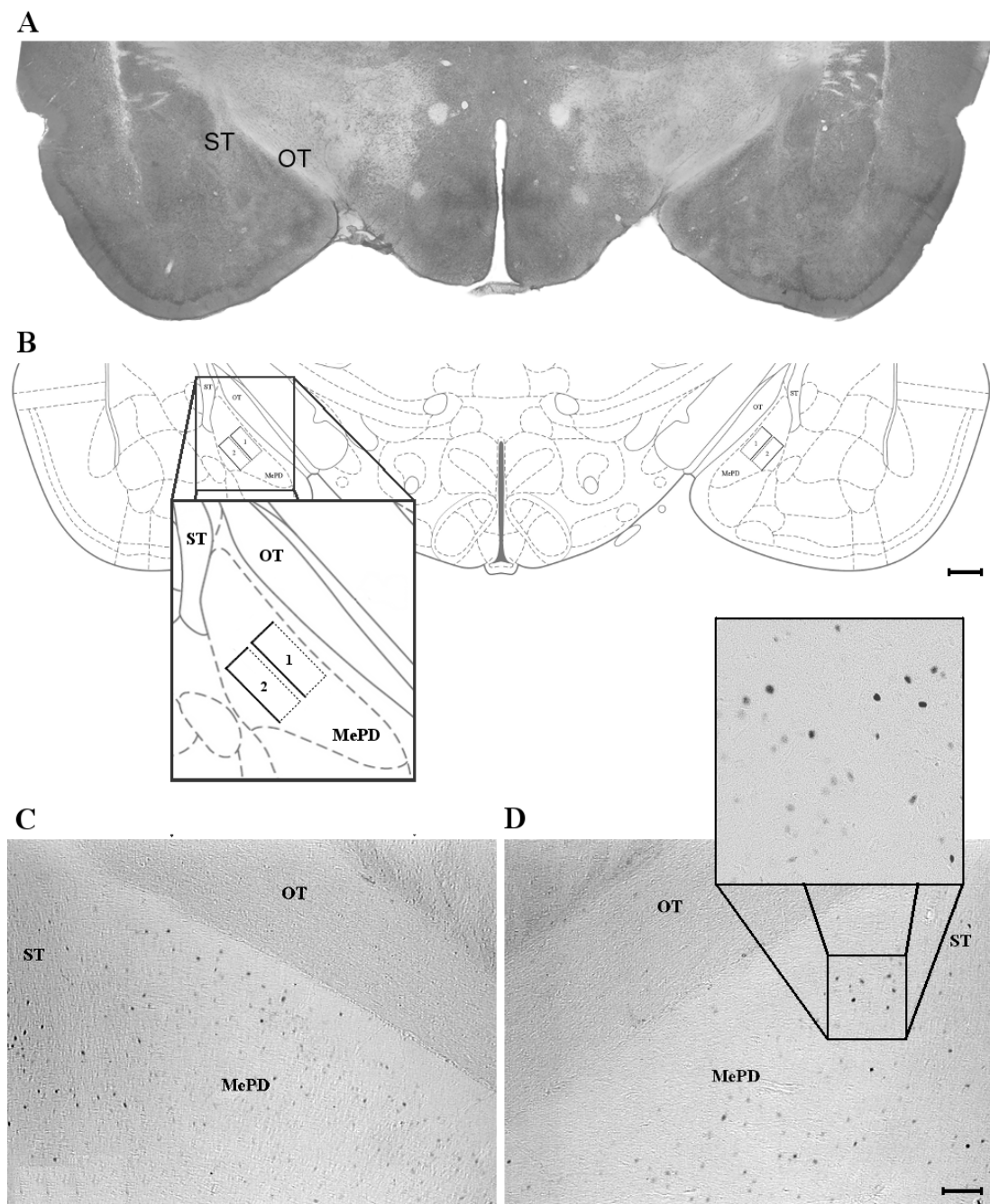


- [31] Haller J, Tóth M, Halász J, De Boer SF: **Patterns of violent aggression-induced brain c-fos expression in male mice selected for aggressiveness.** *Physiol Behav* 2006, **88**:173-182.
- [32] Coolen LM, Peters HJ, Veening JG: **Distribution of Fos immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain.** *Neuroscience* 1997, **77**:1151-1161.
- [33] Roeling TA, Veening JG, Kruk MR, Peters JP, Vermelis ME, Nieuwenhuys R: **Efferent connections of the hypothalamic "aggression area" in the rat.** *Neuroscience* 1994, **59**:1001-1024.
- [34] Rasia-Filho AA, Brusco J, Moreira JE: **Spine plasticity in the rat medial amygdala.** In: *Dendritic Spines: Biochemistry, Modeling and Properties. 1 ed.* Edited by Baylog LR. New York: Nova Science Publishers; 2009:1-25.
- [35] Saha S, Henderson Z, Batten TFC: **Somatostatin immunoreactivity in axon terminals in rat nucleus tractus solitarius arising from central nucleus of amygdala: coexistence with GABA and postsynaptic expression of sst2A receptor.** *J Chem Neuroanat* 2002, **24**:1-13.
- [36] Delfs JR, Dichter MA: **Effects of somatostatin on mammalian cortical neurons in culture: physiological actions and unusual dose response characteristics.** *J Neurosci* 1983, **3**:1176-1188.
- [37] Boehm S, Betz H: **Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors.** *J Neurosci* 1997, **17**:4066-4075.
- [38] Rakovska A, Kiss JP, Raichev P, Lazarova M, Kalfin R, Milenov K: **Somatostatin stimulates striatal acetylcholine release by glutamatergic receptors: an in vivo microdialysis study.** *Neurochem Int* 2002, **40**:269-275.
- [39] Meis S, Sosulina L, Schulz S, Höllt V, Pape HC: **Mechanisms of somatostatin-evoked responses in neurons of the rat lateral amygdala.** *Eur J Neurosci* 2005, **21**:755-62.
- [40] Lu YF, Hattori Y, Moriwaki A, Hayashi Y, Hori Y: **Inhibition of neurons in the rat medial amygdaloid nucleus in vitro by somatostatin.** *Can J Physiol Pharmacol* 1995, **73**:670-674.
- [41] Adamec RE, Morgan HD. **The effect of kindling of different nuclei in the left and right amygdala on anxiety in the rat.** *Physiol Behav* 1994, **55**:1-12.
- [42] Quagliotto E, Neckel H, Riveiro DF, Casali KR, Mostarda C, Irigoyen MC, Dall'ago P, Rasia-Filho AA: **Histamine in the posterodorsal medial amygdala modulates cardiovascular reflex responses in awake rats.** *Neuroscience* 2008, **157**:709-719.
- [43] Delville Y, De Vries GJ, Ferris CF: **Neural connections of the anterior hypothalamus and agonistic behavior in golden hamsters.** *Brain Behav Evol* 2000, **55**:53-76.
- [44] Swanson LW: **Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior.** *Brain Res* 2000, **886**:113-164.
- [45] Naranjo JR, Melltröm B, Achaval M, Sassone-Corsi P: **Molecular pathways of pain: Fos/Jun-mediated activation of a noncanonical AP-1 site in the prodynorphin gene.** *Neuron* 1991, **6**:607-617.

- [46] Tian JB, Bishop GA: **Stimulus-dependent activation of c-Fos in neurons and glia in the rat cerebellum.** *J Chem Neuroanat* 2002, **23**:157-170.
- [47] Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H: **Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis.** *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2005, **29**:1201–1213.
- [48] Roozendaal B, McGaugh JL: **Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task.** *Neurobiol Learn Mem* 1996, **65**:1–8.
- [49] Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M: **Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and *in situ* hybridization study.** *Neurosci Res* 1996, **26**:235–269.
- [50] Makino S, Schulkin J, Smith MA, Pacak K, Palkovits M, Gold PW: **Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress.** *Endocrinology* 1995, **136**:4517–4525.
- [51] Kubo T, Okatani H, Nishigori Y, Hagiwara Y, Fukumori R, Goshima Y: **Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressure responses in rats.** *Neurosci Lett* 2004, **354**:84–86.
- [52] Crane JW, Fernch KR, Buller KM: **Patterns of neuronal activation in the rat brain and spinal cord in response to increasing durations of restraint stress.** *Stress* 2005, **8**:199–211.
- [53] Ebner K, Rupniak NM, Saria A, Singewald N: **Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats.** In: *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America: 23 March 2004*: 4280–4285.
- [54] Singewald N, Chicchi GG, Thurner CC, Tsao KL, Spetea M, Schmidhammer H, Sreepathi HK, Ferraguti F, Singewald GM, Ebner K: **Modulation of basal and stress-induced amygdaloid substance P release by the potent and selective NK1 receptor antagonist L-822429.** *J Neurochem* 2008, **106**:2476-2488.
- [55] Kruk MR, Westphal KG, Van Erp AM, et al: **The hypothalamus: cross-roads of endocrine and behavioural regulation in grooming and aggression.** *Neurosci Biobehav Rev* 1998, **23**:163-177.
- [56] Fish EW, Faccidomo S, Miczek KA: **Aggression heightened by alcohol or social instigation in mice: reduction by the 5-HT(1B) receptor agonist CP-94,253.** *Psychopharmacol* 1999, **146**:391-399.
- [57] Miczek KA, O'Donnell JM: **Intruder evoked aggression in isolated and no isolated mice: effects of psychomotor stimulantes and L-dopa.** *Psychopharmacol* 1978, **57**:47–55.
- [58] Meredith M, Westberry JM: **Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones.** *J Neurosci* 2004, **24**:5719-5725.
- [59] Hasen NS, Gammie SC: **Maternal aggression: New insights from Egr-1.** *Brain Res* 2006, **1108**:147-156.

- [60] Canteras NS, Chiavegatto S, Valle LE, Swanson LW: **Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions.** Brain Res Bull 1997, **44**:297-305.
- [61] Giammanco M, Tabacchi G, Giammanco S, Di Majo D, La Guardia M: **Testosterone and aggressiveness.** Med Sci Monit 2005, **11**:136-145.
- [62] Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW: **Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study.** J Comp Neurol 1990, **294**:76-95.
- [63] Rasia-Filho AA, Fabian C, Rigoti KM, Achaval M: **Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method.** Neuroscience 2004, **126**:839-847.
- [64] Hermel EE, Ilha J, Xavier LL, Rasia-Filho AA, Achaval M: **Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats.** Neurosci Lett 2006, **405**:153-158.
- [65] Cunningham RL, Clairborne BJ, McGinnis MY: **Pubertal exposure to anabolic androgenic steroids increases spine densities on neurons in the limbic system of male rats.** Neuroscience 2007, **150**: 609-615.
- [66] Isoardi NA, Bertotto ME, Martijena ID, Molina VA, Carrer HF: **Lack of feedback inhibition on rat basolateral amygdala following stress or withdrawal from sedative-hypnotic drugs.** Eur J Neurosci 2007, **26**:1036-1044.

Figure 1

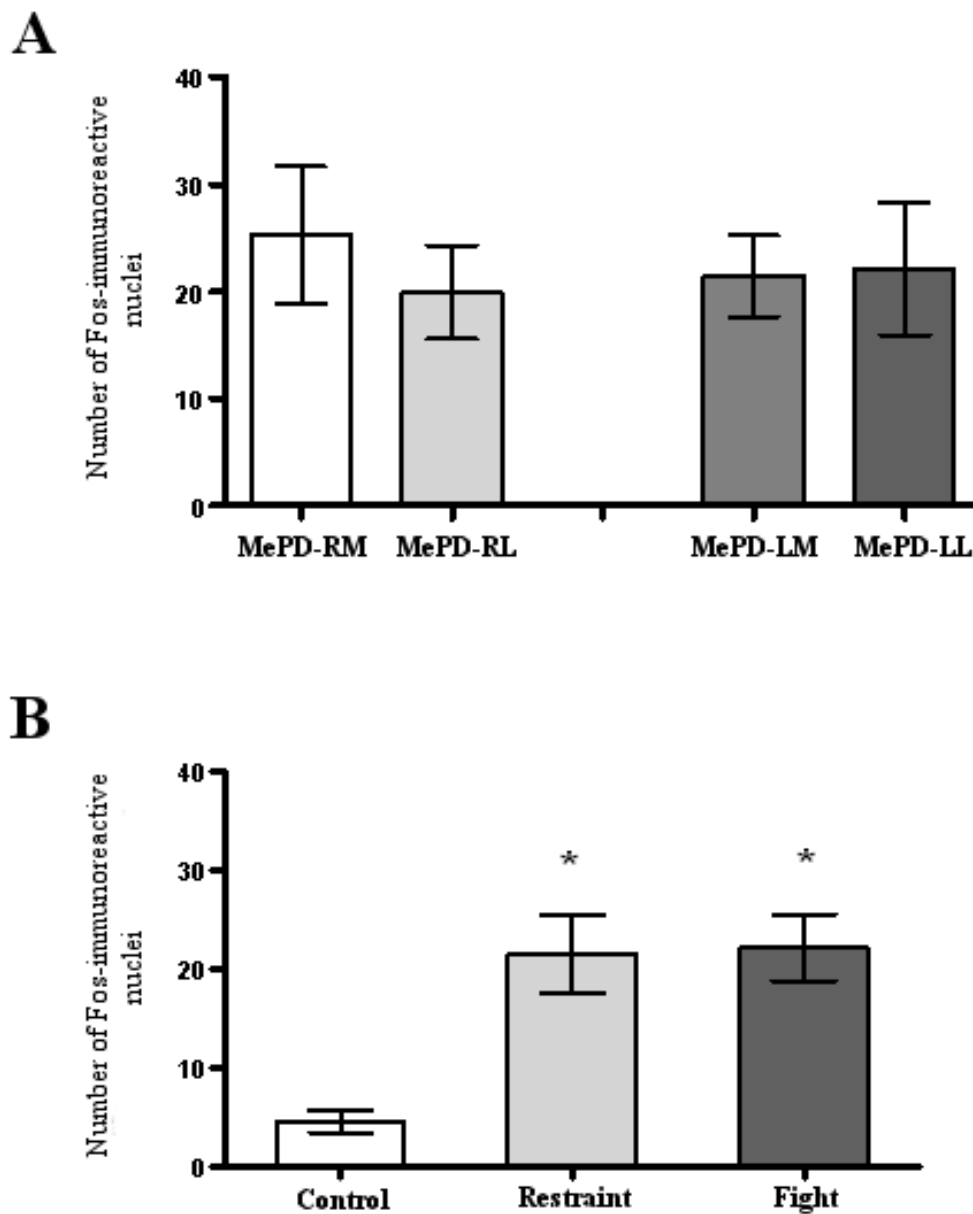


**Figure 1. A.** Cresyl violet staining of a coronal rat brain section showing the ventral location of the optic tract (OT) and the stria terminalis (ST), which form the lateral and superior limits of the posterodorsal medial amygdala (MePD), approximately 3.3 mm posterior to the bregma. **B.** Schematic diagram of a matched coronal brain section showing the right and left MePD and the two rectangles that composed the area of interest where Fos-immunoreactive cells were counted in the “fight” group in each brain hemisphere. Insert box was enlarged to show relevant experimental details of the area of interest for Fos-positive cells counts. Adapted from the atlas of Paxinos and Watson (1998). Scale bar = 1 mm. **C and D.** Digitized microscopic image showing evident Fos-immunoreactive cell bodies (dark) within the right and left MePD, respectively, of a rat from the “fight group”. Only background contrast was adjusted. Scale bar = 100  $\mu$ m.



**Figure 2. A.** Schematic diagram of a coronal brain section showing the right and left MePD and the rectangles that composed the area of interest where Fos-immunoreactive cells were counted in the “control”, “restraint”, and “fight” experimental groups in each brain hemisphere. Adapted from the atlas of Paxinos and Watson (1998). Scale bar = 1 mm. **B-G.** Digitized microscopic image showing representative results for the Fos-immunoreactivity in the right and in the left MePD of rats from the “control” (B and C, respectively), “restraint” (D and E, respectively), and “fight” (F and G, respectively) groups. In **G** is observed dashed lines that represent the limits of MePD. Only background contrast was adjusted. Scale bar = 250  $\mu\text{m}$ .

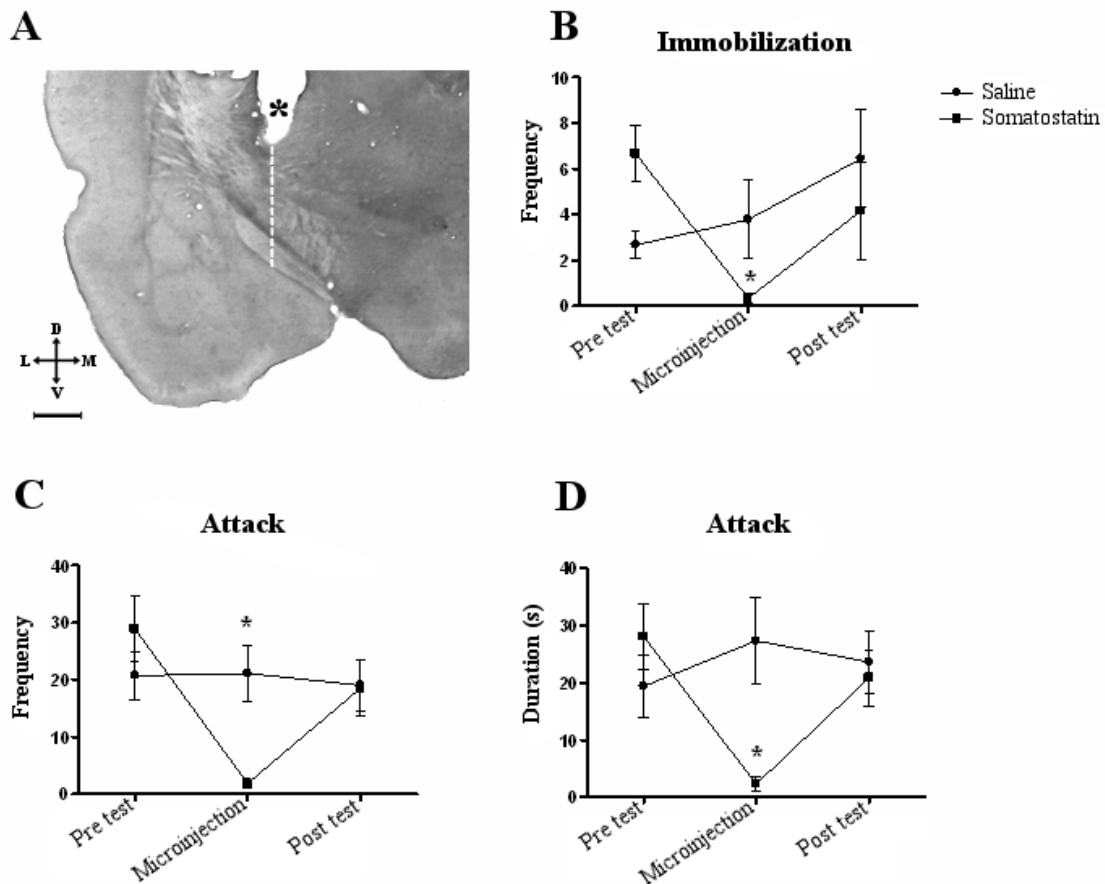
Figure 3



**Figure 3. A.** Mean ( $\pm$  S.E.M.) of the number of Fos-immunoreactive cells in the right posterodorsal medial amygdala (MePD), medial (MePD-RM) and lateral (MePD-RL) aspects, and in the left posterodorsal medial amygdala, medial (MePD-LM) and lateral (MePD-LL) aspects, of resident rats submitted to an aggressive encounter with an intruder (“fight” group). No statistically significant differences were found due to laterality or MePD subregions in this group ( $P > 0.05$ ). **B.** Mean ( $\pm$  S.E.M.) of the number of Fos-immunoreactive cells in the MePD (both right and left hemispheres data were pooled together) counted in the “control”, “restraint”, and “fight” experimental groups. \*  $P < 0.05$  when compared to the “control” group.



Figure 4.



**Figure 4.** **A.** Photomicrography of a representative rat brain coronal section showing the location of the cannula implanted above the posterodorsal medial amygdala (MePD) of rats. Dashed lines represent the course of the microinjection needle, which caused a tiny mechanical lesion (not shown in details). Scale bar = 1.5 mm. **B-D.** Mean ( $\pm$  S.E.M.) of the frequency of the immobilization behavior (**B**), frequency of attacks (**C**) and duration of the attacks (**D**) done by the resident against the intruder during an aggressive encounter prior to stereotaxic surgery (pre-test, control data), on the experimental day of the microinjection of saline (0.3  $\mu$ l) or somatostatin (1  $\mu$ M/0.3  $\mu$ l) in the MePD, and on the day immediately after the microinjection day (post-test, control data). \*  $P > 0.05$  when compared to control data in the same group and to saline microinjection.

**Table 1:** Behavioral parameters involved with MePD microinjections.

	<b>Control Group</b>		<b>Somatostatin Group</b>	
	<b>Frequency</b>	<b>Duration (s)</b>	<b>Frequency</b>	<b>Duration (s)</b>
<b>Pre test (ED 9)</b>				
Social Investigation	33,7 ± 4,2	136,5 ± 31,6	30,6 ± 6,6	111,3 ± 25,4
Deambulation	45,9 ± 4,7	57,7 ± 5,0	43,7 ± 4,6	97,4 ± 21,6
<b>Microinjection (ED 14)</b>				
Social Investigation	39,3 ± 5,8	156,4 ± 58,5	19,8 ± 3,1	109,8 ± 30,3
Deambulation	51,6 ± 5,2	65,8 ± 8,4	41,8 ± 6,4	174,6 ± 40,9
<b>Post test (ED 15)</b>				
Social Investigation	33,2 ± 6,6	85,4 ± 11,8	25,8 ± 5,5	95,3 ± 16,1
Deambulation	39,1 ± 3,0	61,8 ± 4,2	38,3 ± 5,6	67,0 ± 10,1

**Table 1.** Mean ( $\pm$  S.E.M.) for the frequency and duration (in seconds) of the behaviors of social investigation and deambulation done by the resident against the intruder during an aggressive encounter prior to stereotaxic surgery on the experimental day (ED) 9 (pre-test, control data), on the day of the microinjection of saline (0.3  $\mu$ l) or somatostatin (1  $\mu$ M/0.3  $\mu$ l) in the MePD (ED 14), and on the day immediately after the microinjection day (post-test, control data; ED 15). No statistically significant differences were found between groups ( $P > 0.05$ ).

# **A AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO-DORSAL DE RATOS MACHOS ADULTOS DEMONSTRA ESTAR ENVOLVIDA EM RESPOSTAS ESPECÍFICAS DE ESTRESSE E AGRESSÃO**

Daniela Haas<sup>1</sup>, Franklin Panato Back<sup>2</sup>, Gabriel N. S. Pires<sup>2</sup>, Eloisa Pavesi<sup>3</sup>, Elisa

Winkelmann Duarte<sup>4</sup>, Márcia Giovenardi<sup>1,2</sup>, Alberto A. Rasia-Filho<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, R. Sarmiento Leite 245, Porto Alegre 90170-050 RS, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmiento Leite 245, Porto Alegre 90170-050 RS, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade, Florianópolis 88040-900 SC, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade, Florianópolis 88040-900 SC, Brasil

\*Correspondência para: A.A. Rasia-Filho, UFCSPA, Rua Sarmiento Leite 245, Porto Alegre 90170-050 RS, Brasil. Fax. + 55 51 33035982. Endereço eletrônico: [rasiafilho@pq.cnpq.br](mailto:rasiafilho@pq.cnpq.br), [aarf@ufcspa.edu.br](mailto:aarf@ufcspa.edu.br).

## Resumo

A amígdala medial pósterio-dorsal (MePD) faz parte da amígdala expandida e é caracterizada como um subnúcleo entrelaçado na rede neural do comportamento social de ratos. Dados anteriores mostraram que lesões da amígdala medial de ratos promovem diminuição da agressividade, embora o papel da MePD necessite de mais estudos. Ratos *Wistar* adultos machos mantidos em condições laboratoriais normais raramente demonstram agressão quando comparados aos ratos silvestres. Aqui é descrito que confiáveis ocorrências agressivas foram efetivas ao associar diferentes procedimentos: o isolamento em uma caixa-residência por um curto período de tempo, uma suave contenção manual durante 1 minuto, e, a apresentação de um intruso na caixa do residente. A MePD apresentou uma maior imunorreatividade à proteína Fos (Fos-ir) após a contenção e um encontro agressivo com um intruso em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) e não observou-se agrupamentos de núcleos celulares nas regiões medial ou lateral da MePD ou efeito de lateralidade hemisférica ( $p > 0,05$ ). No entanto, houve aumento significativo de células Fos-ir da MePD devido ao 1 minuto de contenção manual (um leve estímulo estressante), em comparação com animais apenas mantidos isolados ( $p < 0,05$ ). Em seguida, um estudo adicional estereotáxico revelou que a microinjeção na MePD de uma dose única e unilateral da somatostatina ( $1 \mu\text{M}/0,3 \mu\text{l}$ ), que é inibidora de neurônios locais, reduziu drasticamente a ocorrência de ataques agressivos contra um intruso quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Desta forma, estes achados acrescentam aos atuais modelos animais para estudos da agressão, sendo agora induzida de forma sólida em ratos *Wistar* “domesticados”, e, lança luz na compreensão do papel da MePD no processamento neural das respostas ao estresse e de específica exposição agressiva.

**Palavras chave:** amígdala expandida, agressividade, comportamento agonístico, expressão da proteína Fos, somatostatina, rato macho.

## 1. Introdução

A amígdala do rato, que não é uma estrutura ou unidade funcional homogênea, tem sido relatada desempenhando um relevante papel nas respostas emocionais, comportamentais e neuroendócrinas [1,2,3]. Várias evidências indicam que os diferentes núcleos da amígdala estão criticamente envolvidos em diversos comportamentos sociais, ao medo, a ansiedade, a respostas ao estresse e à consolidação de memórias aversivas [4,5,6,7,8]. Em gatos, a estimulação de certos núcleos amigdalianos desencadeia comportamentos, tanto de defesa quanto de ataque predatório. Isto é, a estimulação dos núcleos da amígdala medial (AMe), anterior e basomedial facilitam o comportamento defensivo, enquanto que a estimulação dos núcleos centrais e laterais suprimem este comportamento; o efeito oposto ocorre para o comportamento de ataque predatório [9,10]. A AMe é considerada o maior núcleo da amígdala expandida do cérebro em sua porção ventral [11], integra vias neurais provenientes da via olfatória/vomeronasal e faz conexões com diferentes núcleos hipotalâmicos relacionados com a modulação da reprodução e de comportamentos agonísticos [12,13,14,15,16,17].

Lesões na AMe produzem diminuição do comportamento agressivo em ratos. Notavelmente, o subnúcleo pósterodorsal da AMe (MePD) de ratos, possui vias eferentes funcionalmente integradas a respostas neuroendócrinas hipotalâmicas e respostas simpáticas/parassimpáticas que integram respostas comportamentais [15,18,19]. Dados neuroanatômicos sugerem que a MePD pode ser parte de um circuito neural formado pela reciprocidade de áreas interconectadas que participam da regulação de respostas defensivas/agressivas [8], da organização esta que vai ao encontro do modelo de organização cerebral proposto por Newman [13]. Assim, "os dados dos estudos que empregam uma grande variedade de paradigmas, incluindo lesões discretas,

estimulação elétrica, manipulações hormonais ou neurofarmacológicas, e a expressão imediata de genes levaram ... a indicar um grupo comum de áreas límbicas, incluindo grupos de núcleos da amígdala medial expandida, o septo lateral, a área pré-óptica medial, o hipotálamo anterior, o núcleo ventromedial e adjacente ventrolateral do hipotálamo, a substância cinzenta periaquedutal mesencefálica e o *tegmentum* adjacente. Juntas, essas áreas cerebrais influenciam não apenas o comportamento sexual de machos e fêmeas e o comportamento maternal, mas também comportamentos reprodutivos, tais como marcação territorial, agressão territorial e agressão maternal. Estes não são comportamentos produzidos por ações de estado “ligado ou desligado” de qualquer parte da rede ..., mas uma seqüência de múltiplos comportamentos ... isto é, iniciado por emergências de padrão temporal, e, portanto, um padrão de atividade dinâmica em toda a rede neuronal” [13].

É relevante detalhar a participação de algumas áreas do cérebro envolvidas na emissão de comportamentos, o que pode indicar a existência de uma sub-região e de redes funcionais específicas relacionadas com a plasticidade na avaliação de complexas pistas sobre o desencadeamento de respostas comportamentais e adaptativas. Aqui nós apresentamos o desenvolvimento de um protocolo para induzir comportamento agressivo em ratos machos *Wistar* “domesticados”. Esta linhagem de animais, mantidos em condições laboratoriais normais, raramente mostra agressão quando comparados a *Rattus norvegicus* selvagens [19,20]. Como será descrito abaixo, o protocolo comportamental foi elaborado a partir de diferentes procedimentos: isolamento do residente em uma caixa-residência por um curto período de tempo, suave contenção manual durante 1 minuto, e a apresentação de um intruso ao residente na sua caixa-residência. Os dados comportamentais indicam claramente que os machos residentes são instigados a lutar contra outro rato (intruso) sob essas condições. No entanto, a

MePD apresentou uma maior imunorreatividade à proteína Fos (Fos-ir) tanto após o procedimento de contenção manual, como sendo um breve estímulo estressante, quanto após a contenção seguida do encontro agressivo com o intruso. O outro estudo revelou que a microinjeção de uma única dose de somatostatina, que é inibidora de neurônios locais na MePD, reduziu drasticamente a ocorrência de ataques agressivos contra o intruso. Os dados serão discutidos à luz de um modelo de indução de agressividade em ratos de laboratório e o papel funcional da MePD na modulação deste comportamento específico.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Animais**

Ratos machos *Wistar* (90 dias de idade, com cerca de 270 gramas de peso corporal, n = 30) foram criados em colônias sob condições padrão de laboratório, com livre acesso à comida e água, a temperatura da sala em torno de 22 °C e ciclo claro-escuro 12h/12h (ciclo escuro a partir das 17:00h). Cada um desses machos foi denominado de "residente" e mantido individualmente em caixa de acrílico transparente (46 cm x 31 x 17). As caixas residência foram limpas duas vezes por semana para garantir a presença dos odores do residente. Com o objetivo de testar a agressividade dos ratos residentes, machos jovens *Wistar* adultos (70 dias de idade, pesando cerca de 220 gramas, n = 85) foram mantidos sob as mesmas condições de laboratório e denominados de "intrusos". Os intrusos foram usados apenas uma vez. Nenhuma hemorragia, crueldade ou ataques fatais ocorreram em direção ao intruso em qualquer momento do experimento, caso contrário, o experimento deveria ser finalizado imediatamente. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais

utilizados e esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética local (protocolo número 358/07). Além disso, todos os ratos foram manipulados de acordo com as leis internacionais para o cuidado ético e utilização de animais de laboratório (European Communities Council Directive of November 1986, 86/609/EEC).

## **2.2. Procedimento Experimental**

### **2.2.1. Indução do comportamento agressivo em machos residentes**

Ratos machos *Wistar* nascidos e criados em condições padrão de laboratório normalmente não são agressivos. Desta forma, uniu-se diferentes procedimentos em um protocolo de seqüência fixa: isolamento do rato na sua caixa residência, suave contenção manual do rato durante 1 minuto no dia do experimento e, logo após, a inserção do intruso na caixa do residente. Todos os testes de comportamento agressivo foram realizados no ciclo escuro (18:00 – 20:00h) sob iluminação infravermelha. Estudos-piloto guiaram o presente protocolo, mas apenas as melhorias que levaram a resultados consistentes serão descritas aqui.

Para desenvolver o presente protocolo, na primeira etapa, os machos residentes foram divididos em 3 grupos ( $n = 5$  em cada grupo): (1) grupo "controle", que representa os ratos que foram mantidos isolados ao longo de 2 semanas após o início do experimento (dia 0 corresponde ao primeiro dia de isolamento) sem nenhuma manipulação experimental; (2 e 3) grupos "contenção" e "luta", respectivamente, que foram mantidos isolados em sua caixa residência, submetidos à contenção manual e, então, foram apresentados a um intruso nos dias experimentais (DEs) 7 e 9; quando o macho residente foi removido da sua caixa residência, suavemente contido manualmente durante 1 minuto, e este foi deixado livre para movimentar-se por mais 9



minutos na sua caixa de origem. Logo em seguida, o intruso foi colocado na caixa do residente e o comportamento agressivo do residente foi registrado por 10 minutos. No DE 14, o grupo “contenção” foi submetido aos mesmos procedimentos como descritos nos DEs 7 e 9, mas a apresentação ao intruso não foi realizada. O grupo “luta” foi submetido aos mesmos procedimentos como descritos nos DEs 7 e 9, incluindo luta com o intruso durante 15 minutos. Além dos procedimentos nos DEs 7 e 9, este adicional encontro agressivo no DE 14 serviu para a confiabilidade do teste agressivo, e sua extensão para um período de 15 minutos foi baseado em estudos piloto que mostrou que machos exibem maior agressão usando esta última abordagem (dados não mostrados). Em contraste, ratos machos com a mesma idade e, criados em grupo, sob condições de laboratório não apresentam repetido e/ou intenso comportamento agressivo [20; Giovenardi M, observação pessoal].

Os parâmetros comportamentais registrados foram: investigação social (o residente se aproxima do intruso e cheira o seu corpo e/ou órgãos genitais); ataque (o residente se move lateral ou frontalmente, orientado para o dorso do intruso e geralmente observa-se piloereção); imobilização (o residente coloca o seu corpo sobre o intruso e o mantém em posição imóvel durante pelo menos 3 segundos); parado (quando nenhuma ação motora ofensiva ou defensiva esteve ocorrendo); e, deambulação (o residente move-se pela caixa com o objetivo ou não de perseguir o intruso, sendo considerada como um índice para locomoção) [21].

Tanto a duração (em segundos) quanto a frequência desses parâmetros comportamentais foram registrados, assim como previamente validados como índices comportamentais relacionados com a agressão em ratos [21]. Todos os parâmetros comportamentais foram analisados por meio do *software* Noldus® (Noldus Information Technology, Holanda). Os animais do terceiro grupo experimental (grupo “luta”)

apresentaram notável comportamento agressivo no DE 14, que foi requisito experimental para testarmos a expressão de Fos na MePD neste grupo. Desta forma, o delineamento experimental foi desenvolvido para comparar ratos somente isolados e não manipulados ao longo dos dias experimentais (primeiro e/ou grupo “controle”) e seguido de ratos que foram submetidos a suave contenção manual, mas que não foram apresentados ao intruso no DE 14 (segundo e/ou grupo “contenção”).

### **2.2.2 Imunoistoquímica para expressão da imunorreatividade à proteína Fos**

Detalhes relevantes para a compreensão da metodologia empregada precisam ser acrescentados nesta sessão e serão feitos a seguir para justificar a elaboração experimental.

Animais dos 3 grupos experimentais foram estudados para a detecção da proteína fos na MePD. Todos os ratos foram sacrificados às 20:00h no DE 14. O grupo controle permaneceu sem intervenção até o início desta etapa experimental. Os outros dois grupos foram submetidos a 1 minuto de contenção, mas apenas o último grupo foi submetido ao confronto com o intruso. Basicamente, ao mesmo tempo, os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, ip) para a realização da perfusão transcardíaca com solução salina (100 ml), seguido de paraformaldeído a 4% diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,3 (200 ml). Isso ocorreu 90 minutos após o início do experimento para os grupos “contenção” e “luta”. Os cérebros foram removidos e permaneceram na solução fixadora durante a noite em temperatura ambiente. A crioproteção foi obtida armazenando os cérebros em solução de sacarose a 30% a 4 °C. Em seguida, os cérebros foram seccionados em cortes coronais de 50µ m de espessura no aparelho vibrátomo (Leica, Alemanha). Os cortes foram codificados e

mantidos imersos em solução anti congelamento (PBS, água destilada, sacarose, propilenoglicol, Vetec, Brasil) e armazenados em biofreezer a -70 °C até o dia da imunodeteção da proteína Fos.

A imunistoquímica para a proteína Fos foi realizada utilizando o método avidina-biotina-peroxidase [22]. Os cortes de cérebros foram lavados (3 vezes, 10 minutos cada) em tampão PBS e incubados em uma solução de tampão com Triton X-100 (Sigma Chemicals Company, EUA), soro normal de cabra e anticorpo anti-Fos feito em coelho (Ab-5; Calbiochem, USA) em uma diluição de 1:20.000 durante 48h a 4°C e sob agitação contínua. Após esse período, os cortes foram incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente em uma solução de 1:200 de anticorpo biotilado IgG de cabra anti-coelho (Vector Laboratories, USA) e depois foram misturadas em uma solução contendo complexo de avidina-biotina peroxidase na diluição de 1:200 (ABC Elite Kit; Vector Laboratories, EUA) durante o mesmo período de tempo. O complexo de peroxidase foi visualizado durante exposição de 10 minutos em uma solução de cromogeno contendo 0,02% 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemicals Company, EUA) com 0,3% de sulfato de níquel em 0,05 M de tampão Tris (pH 7,6), seguida pela incubação durante 5 minutos de uma solução de glicose oxidase 0,01% (Glicose Oxidase Tipo VII de *Aspergillus Niger*, Sigma Chemicals Company, EUA) and 10% de p-D-glicose (Sigma Chemicals Company, Saint Louis, EUA) para produzir um produto azul escuro. Para o controle negativo da atividade enzimática, alguns cortes foram randomicamente processados mas omitiu-se o anticorpo primário. Isto impediu a marcação de Fos e um controle de fundo negativo (dados não mostrados). Após isso, todos os cortes foram lavados com tampão, coletados em lâminas gelatinizadas, desidratados em etanol, clarificados com xilol e montados com lamínulas utilizando DPX (*distyrene/plasticizer/xylene*). Todos os grupos experimentais

foram processados juntos para evitar possíveis variações inespecíficas no procedimento e nos resultados [23, 24,25].

### **2.2.3. Procedimento de Quantificação**

As imagens microscópicas de cada corte cerebral foram comparadas com desenhos esquemáticos do atlas [26]. A MePD foi localizada em ambos hemisférios, lateralmente ao trato óptico e a “camada molecular” (uma margem de células escassas próximas ao limite da borda medial da MePD) e ventralmente pela estria terminal (Figura 1) [11]. A quantificação do número de células imunomarcadas para proteína Fos dentro da MePD foi realizada de acordo com uma adaptação do procedimento previamente publicado por Newman e colaboradores [27,28,29,30]. Os critérios para a identificação e contagem de células Fos-ir foram: a) estar dentro dos bordos de inclusão na “área de interesse” (ADI) retangular; b) estar corada contrastando com a coloração padrão do fundo; e, c) ter os bordos dos núcleos celulares identificáveis quanto ao esquema padrão previamente esclarecido entre os observadores (Figure 2). Todas as imagens microscópicas foram identificadas em condições constantes de luminosidade e contraste durante a aquisição dos dados experimentais.

Para cada animal, 3 cortes indubitavelmente contendo a MePD direita e esquerda, foram escolhidos entre 2,76 a 3,36 mm posterior ao bregma [26]. Para cada animal, as células Fos-ir da MePD foram desenhadas esquematicamente por dois observadores alheios ao estudo, utilizando uma câmara clara anexada a um microscópio óptico de luz (200 X; Olympus BX-41, Japão). A coincidência do número de células Fos-ir quantificadas pelos dois observadores foi de aproximadamente 97%. Em cima dos desenhos esquemáticos das imagens microscópicas, foi colocado um retângulo

considerado ADI com duas bordas para inclusão e exclusão de células contadas no meio da MePD. Cada retângulo correspondeu a 0,136 mm<sup>2</sup> de área [31]. Em estudo piloto prévio, foi demonstrado que os animais que compuseram o terceiro grupo experimental pareciam ter mais células Fos-ir na MePD do que os controles (dados não mostrados). Então, para esse grupo específico (grupo 3), 2 retângulos ADI adjacentes foram colocados na porção medial e lateral da MePD, respectivamente. O tamanho e a posição de cada ADI são apresentados na Figura 1. Desta forma, também pretendia-se visualizar a presença de agrupamentos celulares Fos-ir nestas porções específicas da MePD, como ocorrido em outros estudos comportamentais [32]. Como um controle “interno” adicional a este experimento, a área ventrolateral do hipotálamo ventromedial, previamente descrita como envolvida com comportamento agressivo, foi também estudada para verificar a expressão de proteína Fos [33]. Notavelmente, esta área hipotalâmica serviu para comparar a especificidade de células Fos-ir presentes na MePD e mostrou, de forma segura, células Fos-ir nos grupos experimentais de ambos os grupos ("luta" e "contenção"), mas não no grupo “controle” (dados não mostrados).

Os dados preencheram todos os requisitos para a utilização de um teste estatístico paramétrico. As contagens obtidas de células Fos-ir no terceiro grupo experimental, submetido à exposição do intruso e que exibiu comportamento agressivo, foram comparados para os efeitos das sub-regiões (medial ou lateral) da MePD, da lateralidade hemisférica e da interação desses fatores, usando o teste da análise da variância (ANOVA) para medidas repetidas. Como será descrito nos resultados e na Figura 3, não foi observado diferença na Fos-ir nas porções medial e lateral da MePD. Portanto, os dados das porções medial e lateral da MePD foram reunidos para todos os grupos experimentais.

A contagem das células correspondem aos valores médios a dos 2 observadores que verificaram 3 cortes de cada hemisfério cerebral, ou seja, cada rato do grupo “luta” gerou dados para o MePD direita que foram combinados com os dados da MePD esquerda. Estas contagens de células Fos-ir foram comparadas pelo teste de ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância estatística foi definido como  $p \leq 0,05$ .

### **2.3. Microinjeção Estereotáxica**

Detalhes relevantes para a compreensão da metodologia empregada precisam ser acrescentados nesta sessão e serão feitos a seguir para justificar a elaboração experimental.

Devido ao fato de os ratos dos grupos “contenção” e “luta” apresentarem semelhante contagem de células Fos-ir na MePD (mas sem efeito de lateralidade hemisférica, como será descrito nos resultados), isto é, o fato de a MePD mostrar um aumento no número de células Fos-ir, tanto após a suave e breve contenção manual, quanto após um encontro agressivo, outro experimento foi realizado e descrito abaixo (como previamente descrito, a MePD de rato pode responder a estes dois estímulos diferentes, estresse e agressão) [16,34].

A fim de aprofundar o estudo na investigação da MePD estar envolvida na modulação do comportamento agressivo, foi microinjetado, unilateralmente, somatostatina diretamente na MePD. Este neuropeptídeo possui, marcadamente, ações locais inibitórias [35,36,37,38,39,40] e, portanto, inicialmente foi hipotetizado que poderia reduzir o comportamento agressivo de machos submetidos neste protocolo.

Ao total, quinze ratos machos *Wistar* foram mantidos sob as mesmas condições padrão de laboratório. Foram submetidos ao isolamento e à experiência agressiva com um intruso nos DEs 7 e 9, como descrito no protocolo de imunodeteção à proteína Fos. Os dois registros do comportamento agressivo antes da cirurgia estereotáxica geraram resultados que foram reunidos e forneceram os dados controle para as futuras comparações dos resultados pós microinjeção. No DE 10, os ratos residentes foram anestesiados com quetamina e xilazina (90 mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente) e, por meio de cirurgia estereotáxica foi implantada uma cânula unilateral (0,6 mm de diâmetro externo) 2 mm acima da MePD direita. Este hemisfério foi escolhido com base na ausência de um efeito de lateralidade na expressão da proteína Fos, conforme exposto anteriormente, e com base em observações prévias que demonstraram fortes respostas comportamentais, cardiovasculares e ansiogênicas promovidas pela MePD direita [25,41,42]. As coordenadas estereotáxicas utilizadas foram: 3,4 mm posterior ao bregma; 3,6 mm lateral à sutura sagital; e, 5,9 mm abaixo da dura-máter.

Quatro dias após a cirurgia (DE 14), e com os animais apresentando aparente comportamento motor normal (deambulação) e de ingestão alimentar (sólidos e líquidos), os ratos foram selecionados de forma randomizada para receber uma das seguintes microinjeções na MePD: salina (0,3 µl, n = 9) ou somatostatina (1 µ M/0,3 µl; Sigma Chemicals Co., E.U.A., n = 6). Devido a ocorrência de o comportamento agressivo ter sido considerado alto para um rato *Wistar* com a utilização deste protocolo, assumiu-se que maiores quantificações do comportamento de ataque não poderiam ser consistentemente encontrados para atingir diferença estatística. Desta forma, nenhuma substância excitatória foi microinjetada para evitar resultados enganosos, devido a um "efeito de teto" nos dados, e/ou causar injúria para o intruso e ser eticamente questionável. Por outro lado, não foi nossa intenção estabelecer uma

curva dose x efeito com a microinjeção de somatostatina na MePD. Preferencialmente, nós gostaríamos de mostrar que a inibição química da MePD poderia diminuir a ocorrência agressiva, com o objetivo de avançar na interpretação do papel da MePD sobre a agressão e a sua imunorreatividade Fos celular, como previamente encontrados nas mesmas condições experimentais. A dose de somatostatina foi especificamente escolhida com base em resultados anteriores que mostraram claramente suas ações inibitórias em diversas abordagens experimentais e em diferentes áreas cerebrais [36,37,38,39], incluindo a AMe [40]. As microinjeções na MePD do rato foram feitas simultaneamente com a sua contenção manual de forma suave; procedimento realizado para que os animais dos grupos estudados não fossem submetidos a estresse excessivo ou desconforto. Nenhuma alteração evidente no comportamento foi observada após a microinjeção. O deslocamento do líquido e o trânsito da bolha de ar no interior do cateter conectado a microseringa de Hamilton (5  $\mu$ l) foi usado para monitorar a microinjeção. Esta teve duração de 1 minuto e a agulha permaneceu dentro da cânula por mais 1 minuto para evitar refluxo [42]. Após este procedimento, cada rato foi colocado em sua caixa residência. Passados 8 minutos, um intruso foi inserido na caixa do residente e os mesmos parâmetros comportamentais (descritos na página 94) foram registrados durante 15 minutos. Para garantir que o efeito do veículo ou da somatostatina microinjetados na MePD não produzisse alteração prolongada na agressividade do macho, mais um encontro do rato residente com um rato intruso foi realizado após 24 horas (no DE 15). Este último registro do residente contra o intruso teve a duração de 10 minutos, sem qualquer microinjeção. Sendo assim, no final do experimento, o registro dos comportamentos dos 3 momentos experimentais ficaram disponíveis para as comparações entre os grupos: os dados controle pré-microinjeção, os resultados do dia da microinjeção, e os dados após um dia da microinjeção.



Ao mesmo DE 15, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.) e para a realização da perfusão transcardíaca com solução salina 9% e solução de formol 10% tamponados. Os cérebros foram removidos, seccionados em 60  $\mu$  m de espessura no vibrátomo (Leica Vibratome 1000), corados com hematoxilina-eosina e a exata localização da microinjeção foi comparada com o atlas [26]. Somente aqueles ratos em que as microinjeções estavam localizadas na MePD foram considerados para análise dos seus resultados (Figura 4, A). Os resultados encontrados a partir de microinjeções que produziram sinais de hemorragia intraparenquimatosa, evidência de lesão mecânica na MePD, na estria terminal ou trato óptico foram descartados dos resultados apresentados. A taxa de difusão das substâncias microinjetadas na MePD não foram diretamente avaliadas no presente estudo. Além disso, os animais em que a cânula foi implantada nas imediações da MePD formaram um grupo adicional chamado de "não-alvo", que serviu como controle para verificar o efeito da difusão da droga nos núcleos amigdalianos adjacentes, gânglios da base e cápsula interna. Estes dados não reproduziram os efeitos obtidos com a microinjeção de somatostatina na MePD (dados não mostrados).

Os resultados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variância. A frequência e a duração dos parâmetros comportamentais registrados foram transformadas utilizando o método dos quadrados para médias ponderadas. Logo em seguida, os valores foram comparados entre os grupos (salina ou somatostatina microinjetadas na MePD), condições experimentais registradas (controle da pré-microinjeção, microinjeção por si só, controle pós-microinjeção), e a interação desses fatores foi testada por uma ANOVA de duas vias para medidas repetidas e o teste Fisher LSD (*Least Significant Difference*) como pós-teste. O nível de significância estatística foi definido com  $p \leq 0,05$ .

### 3. Resultados

Os animais submetidos à suave contenção manual e exposição a um intruso mostraram um notável comportamento agressivo, como será descrito no experimento da microinjeção e nos dados a seguir (Figura 4 e Tabela 1). Como regra geral, após curta latência, o intruso era rapidamente atacado e os residentes mostraram diversas posturas agressivas. O intruso geralmente demonstrava submissão perante o macho residente. Tentativas de copular com o intruso não foram observadas, salvo algumas montas com movimentos pélvicos na lateral do corpo do rato intruso.

#### 3.1. Expressão da proteína Fos

A análise microscópica mostrou marcação de células Fos-ir na MePD nos grupos experimentais 2 e 3 (Figura 2). No entanto, o número de células marcadas é quase inexistente nos ratos que foram submetidos somente ao isolamento (grupo “controle”). Em contraste, a quantidade de células Fos-ir foi expressiva e distribuída de forma homogênea na MePD dos ratos submetidos ao isolamento/contenção (grupo 2) e ao isolamento/contenção/luta (grupo 3).

Ao comparar as contagens de marcações de células Fos-ir na MePD do grupo 3, tanto a porção medial quanto a lateral, em ambos os hemisférios direito e esquerdo, verificou-se que não houve diferença significativa para o efeito de sub-regiões [F (1,8) = 1,10, p = 0,32], lateralidade [F (1,8) = 0,01, p = 0,9], ou a interação entre esses dois fatores [F (1,8) = 1,80, p = 0,21] (Figura 3).

Por outro lado, quando somados os dados das porções medial e lateral das células Fos-ir na MePD para os 3 grupos experimentais, observamos que houve uma

diferença estatisticamente significativa entre os grupos [ $F(2,12) = 5,37, p = 0,02$ ], mas não para a lateralidade (diferença entre os hemisférios direito e esquerdo) [ $F(1,12) = 0,26, p = 0,61$ ], ou a interação entre esses fatores [ $F(2,12) = 0,09, p = 0,91$ ]. Devido ao fato dos grupos serem diferentes entre si, independentemente do hemisfério estudado, o pós-teste Fisher LSD foi empregado para comparar os resultados dos lados direito e esquerdo da MePD reunidos. O teste de Tukey revelou que o grupo “controle”, submetido apenas ao isolamento, apresentou menor contagem de células Fos-ir na MePD em comparação com os grupos “contenção” e “luta” ( $p < 0,05$ ). Ratos dos grupos “contenção” e “luta” mostraram semelhante contagem de células Fos-ir ( $p > 0,05$ , Figura 3).

### **3.2. Microinjeção de somatostatina**

Em relação à microinjeção de somatostatina, o isolamento e a contenção geraram confiável demonstração de comportamento agressivo (dados apresentados na Figura 4). Isto pode ser evidenciado pela frequência de ataques em relação ao grupo controle (salina). Este resultado agressivo pode ser encontrado nos DEs 7 e 9 e, para aqueles ratos que compuseram o grupo “luta”, também no DE 14. Estes valores formaram dados de referência para comparar com as observações comportamentais obtidas após a microinjeção MePD de salina ou somatostatina. Houve uma diferença estatisticamente significativa quando comparados os dois grupos experimentais (grupo salina e grupo somatostatina) no dia da microinjeção para o comportamento de ataque [ $F(29,4) = 3,23, p = 0,01$ ]. O pós-teste de Fisher LSD mostrou que, em comparação ao grupo salina, os animais microinjetados com somatostatina mostraram uma redução estatisticamente significativa no comportamento agressivo de ataque (Figura 4,  $p <$

0,05). Animais microinjetados com somatostatina na MePD também diminuíram a ocorrência do comportamento de imobilização quando comparados com os valores da pré-microinjeção. Um dia após a microinjeção estes comportamentos acima referidos foram semelhantes aos valores pré-teste e não foram estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ). A salina não promoveu nenhuma diferença estatística em relação aos valores de pré-teste ou pós-teste ( $p > 0,05$ ). O comportamento de investigação social e deambulação não foram afetados tanto nos animais microinjetados com salina quanto com somatostatina ( $p > 0,05$ ). Os dados estão descritos na Tabela 1.

#### **4. Discussão**

Os resultados indicam que ratos machos *Wistar*, criados em condições padrão de laboratório, podem apresentar comportamento agressivo quando isolados, suavemente contidos manualmente e confrontados com um intruso na sua caixa moradia. Este é um método simples e confiável que pode fornecer outras abordagens experimentais para testar a base neurofisiológica e a modulação farmacológica do comportamento agressivo. Além disso, os resultados sugerem que a MePD pode estar envolvida na modulação neural de estímulos estressantes e do comportamento agressivo [8,20,43,44]. Quanto à expressão da proteína Fos na MePD, nos ratos do grupo “luta” não foram observados a existência de agrupamentos nucleares de células Fos-ir nas porções medial e lateral, tampouco foi encontrado diferença estatística ao comparar dados da MePD direita com a MePD esquerda. O comportamento agressivo em ratos submetidos a este protocolo poderá ser reduzida a uma única e unilateral microinjeção de somatostatina na MePD, sem afetar a atividade motora. Estes são dados novos sobre a participação da

MePD no comportamento agressivo e alguns comentários metodológicos serão abordados a fim de resolver estas questões.

A expressão da proteína Fos foi considerada durante anos como um marcador de ativação celular neuronal [45]. Diferentes paradigmas experimentais foram empregados usando o c-fos ou imunodeteção Fos com o propósito de descobrir quais áreas do cérebro estariam envolvidas com o processamento da informação sensorial ou ocorrência comportamental [13,32,45,46]. Devido ao tempo necessário para chegar a expressão máxima [22], a ausência de células Fos-ir em certas áreas do cérebro não implicam, necessariamente, que não estavam participando de um circuito neural. É concebível que neurônios Fos-ir não detectáveis indicariam que, naquele momento específico, a área estudada não pudesse ainda estar envolvida na tarefa em um circuito hierárquico ou circuito paralelo para o processamento neural. Mas, por meio dos dados resultantes desta pesquisa, salientamos que os machos submetidos ao isolamento e contenção mostraram semelhantes contagens de células Fos-ir quando comparados aos ratos que foram também submetidos a um comportamento agressivo contra um intruso. Isto pode indicar que a MePD respondeu a um leve estresse e/ou um condicionamento baseado na aprendizagem, mas também pode estar envolvida na modulação do comportamento agressivo.

A contenção serve como um modelo animal de estímulo estressante e para a indução de resposta neuroendócrina ao estresse. A AMe é afetada por esteróides adrenais liberados em situações estressantes [47,48] por exibir células contendo RNAm receptores para glicocorticóides [49] e RNAm receptores para o hormônio liberador da corticotropina [50]. Outros dados indicam que o estresse por contenção aumentou o número de neurônios Fos-ir na AMe ao mesmo tempo que aumentou a pressão arterial [51]. Assim, os neurônios da AMe apresentaram proporcional aumento na atividade e

na presença da proteína Fos em resposta a períodos agudos de contenção - 15, 30 ou 60 minutos [7,52]. Recentemente, foi relatado que estresse por contenção aguda, por 1 hora em um único dia, reduziu a densidade de espinhos dendríticos da MePD; este achado não foi encontrado quando a contenção durou 6 horas ou em repetidas e crônicas (6 horas por dia ao longo de 28 dias) contenções [8]. O estresse por imobilização também causou uma marcante liberação de substância P na AMe - um neurotransmissor/neuromodulador relevante no processamento de estados emocionais, implicando à AMe funções com o processamento de estímulos estressantes bem como distúrbios relacionados ao estresse [53,54]. Estes resultados podem ainda somar ao presente achado de neurônios Fos-ir na MePD em ratos contidos por 1 minuto e reforçar o papel do MePD no processamento de estímulos estressantes [8]. Além disso, devido ao fato da AMe ter sido previamente associada à consolidação de memórias aversivas [48], é possível que a repetição da contenção seguida pela colocação de um intruso na caixa do residente possa ter levado a um tipo de resposta condicionada associativa, como observado em ratos do grupo “luta” no DE 14, o que também provocou a expressão de células Fos-ir na MePD do grupo “contenção”.

No entanto, os níveis plasmáticos de corticosterona exercem um controle de *feedback* positivo sobre os mecanismos cerebrais envolvidos no comportamento agressivo, que levam a sugerir que os hormônios do estresse facilitariam a ocorrência da agressão [55]. O isolamento e a contenção podem ter aumentado os hormônios relacionados ao estresse antes do confronto com um intruso, o que suscita uma série de diferentes estímulos no macho residente a fim de derrotar o rival intruso. O repertório comportamental de luta é composto por sequenciais encontros corporais típicos, com o residente mostrando comportamentos ofensivos e o intruso demonstrando comportamento de defesa e posturas agressivas [16,56,57]. Neurônios Fos-ir foram

consistentemente encontrados na MePD após a exibição do comportamento agressivo em ratos, embora esse resultado por si só não prova que a MePD esteja envolvida com a agressão. A somatostatina microinjetada na MePD foi capaz de reduzir a ocorrência do comportamento de ataque do rato residente sem alterar sua locomoção, avaliado neste experimento. Então, em conjunto, sugere-se que a MePD também possa estar envolvida com a modulação da agressão. Na verdade, o subnúcleo ântero-dorsal da AMe recebe informação olfatória e, depois de determinar a sua relevância social, os envia para o MePD, via núcleos intercalados amigdalianos [58]. A MePD pode ser funcionalmente relevante em contextos ofensivos e na agressão maternal [17,43,59], mas não para reações de defesa contra predadores naturais [60]. Os presentes dados acrescentam a este conceito e ao modelo de rede neural, proposto anteriormente por Newman, para a modulação de comportamento social [13].

Como observado em diversas espécies, os machos são claramente mais agressivos que as fêmeas, fato este que direcionou estudos dos efeitos dos hormônios gonadais sobre o comportamento agressivo [61]. Receptores de testosterona estão localizados nos neurônios de áreas do cérebro envolvidas com o comportamento de agressão [62] e diversos efeitos de hormônios gonadais e/ou dimorfismo sexual na MePD de ratos [63,64,65]. Com o mesmo paradigma residente-intruso ou com a apresentação de uma fêmea receptiva, foi revelado que a porção medial, mas não a lateral, da MePD mostrou células Fos-ir seguidos de comportamentos agressivo ou sexual em ratos machos selvagens *Brown Norway*. A porção caudal da MePD também mostrou-se células Fos-ir depois de encontros sexuais ou agressivos [20]. Esforços futuros podem demonstrar se a expressão da proteína Fos relacionadas com o resultado do comportamento agressivo em machos ocorrem na mesma sub-população neuronal da MePD que possuem receptores androgênicos. Além disso, será interessante observar as

conseqüências da ativação neuronal da MePD na secreção neuroendócrina e/ou mnemônicas, comportamento social ou de adaptação de sistemas moduladores evocados por uma experiência agressiva. Desta forma, a ativação de receptores de glicocorticóides na AMe é importante para a formação da memória aversivas em ratos [7]. Pelo menos para o complexo amigdaliano basolateral, a supressão da inibição nos neurônios de projeções são cruciais para o surgimento de respostas emocionais negativas, incluindo o medo exagerado e a ansiedade em ratos estressados [66]. Espera-se que alguns destes modelos animais e dados experimentais possam contribuir para revelar a ocorrência de agressão normal e anormal não somente em ratos, mas também nos seres humanos, para as quais, funções amigdalianas são relevantes [16].

### **Agradecimentos**

Os autores são gratos à Sra. Nathalie LF Sandi pela sua contribuição para o desenvolvimento inicial do presente protocolo e ao Dr. Leder L. Xavier (PUCRS, Brasil) por seus comentários críticos sobre a quantificação dos dados. Apoiados por CAPES e CNPq. ARRF é um pesquisador do CNPq.



## Referências

- [1] Davis M: **Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear potentiated startle.** *Am Psychol* 2006, **61**:741–756.
- [2] Rasia-Filho AA, Londero RG, Achaval M: **Functional activities of the amygdala: an overview.** *J Psychiatry Neurosci* 2000, **25**:14-23.
- [3] Swanson LW, Petrovich GD: **What is the amygdala?** *Trends Neurosci* 1998, **21**:323-331.
- [4] Adamec RE, McKay D: **Amygdala kindling, anxiety, and corticotrophin releasing factor (CRF).** *Physiol Behav* 1993, **54**:423–431.
- [5] Carter RN, Pinnock SB, Herbert J: **Does the amygdala modulate adaptation to repeated stress?** *Neuroscience* 2004, **126**:9–19.
- [6] David JT, Cervantes MC, Trosky KA, Salinas JA, Delville Y: **A neural network underlying individual differences in emotion and aggression in male golden hamsters.** *Neuroscience* 2004, **126**:567-578.
- [7] Roozendaal B, McGaugh JL: **Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task.** *Neurobiol Learn Mem* 1996, **65**: 1–8.
- [8] Marcuzzo S, Dall'oglio A, Ribeiro MF, Achaval M, Rasia-Filho AA: **Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats.** *Neurosci Lett* 2007, **424**:16-21.
- [9] Smith DA, Flynn JP: **Afferent projections to affective attack sites in cat hypothalamus.** *Brain Res* 1980, **194**:41-51.
- [10] Shaikh MB, Siegel A: **Neuroanatomical and neurochemical mechanisms underlying amygdaloid control of defensive rage behavior in the cat.** *Braz J Med Biol Res* 1994, **27**:2759-2779.
- [11] de Olmos J, Beltramino CA, Alheid G: **Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey.** In: *The Rat Nervous System*. Edited by Paxinos G. San Diego: Academic Press; 2004:509–603.
- [12] Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW: **Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat.** *J Comp Neurol* 1995, **360**:213–245.
- [13] Newman SW: **The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network.** *Ann NY Acad Sci* 1999, **877**:242–257.
- [14] Meredith M, Westberry JM: **Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones.** *J Neurosci* 2004, **24**:5719–5725.
- [15] Choi GB, Dong H-W, Murphy AJ, et al: **Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus.** *Neuron* 2005, **46**:647-660.
- [16] Rasia-Filho AA, Giovenardi M, de Almeida RM: **Drugs and aggression.** *Recent Pat CNS Drug Discov* 2008, **3**:40-49.

- [17] Nelson RJ, Trainor BC: **Neural mechanisms of aggression**. *Nature* 2007, **8**:536-546.
- [18] Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW: **Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems**. *Brain Res Rev* 2001, **38**:247-289.
- [19] De Almeida RM, Lucion AB: **Role of the intruder in the aggressive behavior of colonies of wild rats (*Rattus norvegicus*)**. In: *Animal Model in Psychopharmacology*. Edited by Olivier B. Verlag; 1991:347-356.
- [20] Veening JG, Coolen LM, de Jong TR, Joosten HW, de Boer SF, Koolhaas JM, Olivier B: **Do similar neural systems subserve aggressive and sexual behaviour in male rats? Insights from c-fos and pharmacological studies**. *Eur J Pharmacol* 2005, **526**:226-239.
- [21] Blanchard RJ, Wall PM, Blanchard DC: **Problems in the study of rodent aggression**. *Horm Behav* 2003, **44**:161-170.
- [22] Cezario AF, Ribeiro-Barbosa ER, Baldo MV, Canteras NS: **Hypothalamic sites responding to predator threats - the role of the dorsal preammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior**. *Eur J Neurosci* 2008, **28**:1003-1015.
- [23] Rasia-Filho AA, Xavier LL, dos Santos P, Gehlen G, Achaval M: **Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats**. *Brain Res Bull* 2002, **58**:67-75.
- [24] Martinez FG, Peyré-Tartaruga LA, Hermel EES, Xavier LL, Rasia-Filho AA, Achaval M: **Intermediate filament expression in the medial amygdala subnuclei during postnatal development of male and female rats**. In: *Proceedings of the 5th Forum of the Federation of European Neuroscience Societies: 2006: Viena: FENS Abstracts; 2006:A155.6*.
- [25] de Castilhos J, Rigon P, Xavier LL, Rasia-Filho AA, Achaval M: **Sex differences in NADPH-diaphorase activity in the rat posterodorsal medial amygdala**. *Brain Res* 2009 DOI 19815007.
- [26] Paxinos G, Watson C: *The Rat Brain Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press; 1998.
- [27] Kollack SS, Newman SW: **Mating behavior induces selective expression of Fos protein within the chemosensory pathways of the male Syrian hamster brain**. *Neurosci Lett* 1992, **143**:223-228.
- [28] Kollack-Walker S, Newman SW: **Mating and agonistic behavior produce different patterns of Fos immunolabeling in the Syrian hamster brain**. *Neuroscience* 1995, **66**:721-736.
- [29] Kollack-Walker S, Newman SW: **Mating-induced expression of c-fos in the male Syrian hamster brain: role of experience, pheromones, and ejaculations**. *J Neurobiol* 1997, **32**:481-501.
- [30] Parfitt DB, Newman SW: **Fos-immunoreactivity within the extended amygdala is correlated with the onset of sexual satiety**. *Horm Behav* 1998, **34**:17-29.

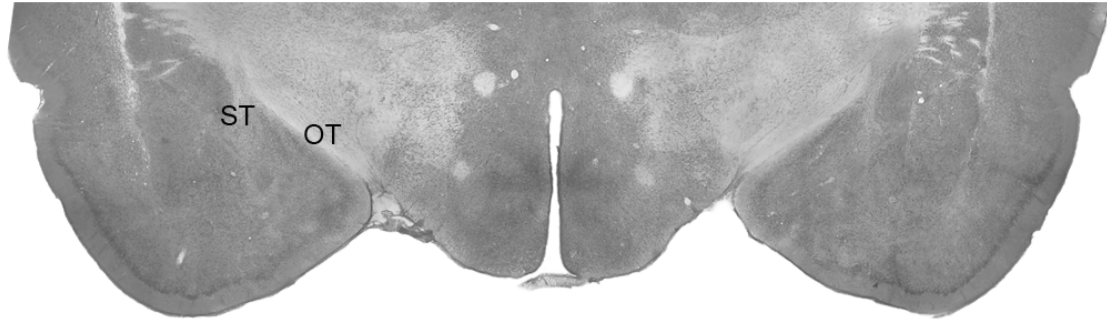
- [31] Haller J, Tóth M, Halász J, De Boer SF: **Patterns of violent aggression-induced brain c-fos expression in male mice selected for aggressiveness.** *Physiol Behav* 2006, **88**:173-182.
- [32] Coolen LM, Peters HJ, Veening JG: **Distribution of Fos immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain.** *Neuroscience* 1997, **77**:1151-1161.
- [33] Roeling TA, Veening JG, Kruk MR, Peters JP, Vermelis ME, Nieuwenhuys R: **Efferent connections of the hypothalamic "aggression area" in the rat.** *Neuroscience* 1994, **59**:1001-1024.
- [34] Rasia-Filho AA, Brusco J, Moreira JE: **Spine plasticity in the rat medial amygdala.** In: *Dendritic Spines: Biochemistry, Modeling and Properties. 1 ed.* Edited by Baylog LR. New York: Nova Science Publishers; 2009:1-25.
- [35] Saha S, Henderson Z, Batten TFC: **Somatostatin immunoreactivity in axon terminals in rat nucleus tractus solitarius arising from central nucleus of amygdala: coexistence with GABA and postsynaptic expression of sst2A receptor.** *J Chem Neuroanat* 2002, **24**:1-13.
- [36] Delfs JR, Dichter MA: **Effects of somatostatin on mammalian cortical neurons in culture: physiological actions and unusual dose response characteristics.** *J Neurosci* 1983, **3**:1176-1188.
- [37] Boehm S, Betz H: **Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors.** *J Neurosci* 1997, **17**:4066-4075.
- [38] Rakovska A, Kiss JP, Raichev P, Lazarova M, Kalfin R, Milenov K: **Somatostatin stimulates striatal acetylcholine release by glutamatergic receptors: an in vivo microdialysis study.** *Neurochem Int* 2002, **40**:269-275.
- [39] Meis S, Sosulina L, Schulz S, Höllt V, Pape HC: **Mechanisms of somatostatin-evoked responses in neurons of the rat lateral amygdala.** *Eur J Neurosci* 2005, **21**:755-62.
- [40] Lu YF, Hattori Y, Moriwaki A, Hayashi Y, Hori Y: **Inhibition of neurons in the rat medial amygdaloid nucleus in vitro by somatostatin.** *Can J Physiol Pharmacol* 1995, **73**:670-674.
- [41] Adamec RE, Morgan HD. **The effect of kindling of different nuclei in the left and right amygdala on anxiety in the rat.** *Physiol Behav* 1994, **55**:1-12.
- [42] Quagliotto E, Neckel H, Riveiro DF, Casali KR, Mostarda C, Irigoyen MC, Dall'ago P, Rasia-Filho AA: **Histamine in the posterodorsal medial amygdala modulates cardiovascular reflex responses in awake rats.** *Neuroscience* 2008, **157**:709-719.
- [43] Delville Y, De Vries GJ, Ferris CF: **Neural connections of the anterior hypothalamus and agonistic behavior in golden hamsters.** *Brain Behav Evol* 2000, **55**:53-76.
- [44] Swanson LW: **Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior.** *Brain Res* 2000, **886**:113-164.
- [45] Naranjo JR, Melltröm B, Achaval M, Sassone-Corsi P: **Molecular pathways of pain: Fos/Jun-mediated activation of a noncanonical AP-1 site in the prodynorphin gene.** *Neuron* 1991, **6**:607-617.

- [46] Tian JB, Bishop GA: **Stimulus-dependent activation of c-Fos in neurons and glia in the rat cerebellum.** *J Chem Neuroanat* 2002, **23**:157-170.
- [47] Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H: **Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis.** *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2005, **29**:1201–1213.
- [48] Roozendaal B, McGaugh JL: **Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task.** *Neurobiol Learn Mem* 1996, **65**:1–8.
- [49] Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M: **Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and *in situ* hybridization study.** *Neurosci Res* 1996, **26**:235–269.
- [50] Makino S, Schulkin J, Smith MA, Pacak K, Palkovits M, Gold PW: **Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress.** *Endocrinology* 1995, **136**:4517–4525.
- [51] Kubo T, Okatani H, Nishigori Y, Hagiwara Y, Fukumori R, Goshima Y: **Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressure responses in rats.** *Neurosci Lett* 2004, **354**:84–86.
- [52] Crane JW, Fernch KR, Buller KM: **Patterns of neuronal activation in the rat brain and spinal cord in response to increasing durations of restraint stress.** *Stress* 2005, **8**:199–211.
- [53] Ebner K, Rupniak NM, Saria A, Singewald N: **Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats.** In: *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America: 23 March 2004*: 4280–4285.
- [54] Singewald N, Chicchi GG, Thurner CC, Tsao KL, Spetea M, Schmidhammer H, Sreepathi HK, Ferraguti F, Singewald GM, Ebner K: **Modulation of basal and stress-induced amygdaloid substance P release by the potent and selective NK1 receptor antagonist L-822429.** *J Neurochem* 2008, **106**:2476-2488.
- [55] Kruk MR, Westphal KG, Van Erp AM, et al: **The hypothalamus: cross-roads of endocrine and behavioural regulation in grooming and aggression.** *Neurosci Biobehav Rev* 1998, **23**:163-177.
- [56] Fish EW, Faccidomo S, Miczek KA: **Aggression heightened by alcohol or social instigation in mice: reduction by the 5-HT(1B) receptor agonist CP-94,253.** *Psychopharmacol* 1999, **146**:391-399.
- [57] Miczek KA, O'Donnell JM: **Intruder evoked aggression in isolated and no isolated mice: effects of psychomotor stimulantes and L-dopa.** *Psychopharmacol* 1978, **57**:47–55.
- [58] Meredith M, Westberry JM: **Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones.** *J Neurosci* 2004, **24**:5719-5725.
- [59] Hasen NS, Gammie SC: **Maternal aggression: New insights from Egr-1.** *Brain Res* 2006, **1108**:147-156.

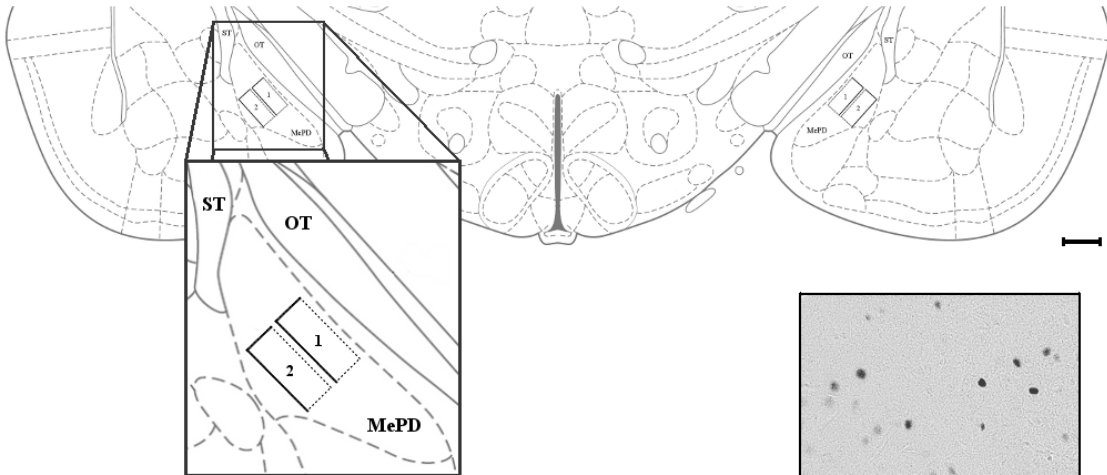
- [60] Canteras NS, Chiavegatto S, Valle LE, Swanson LW: **Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions.** Brain Res Bull 1997, **44**:297-305.
- [61] Giammanco M, Tabacchi G, Giammanco S, Di Majo D, La Guardia M: **Testosterone and aggressiveness.** Med Sci Monit 2005, **11**:136-145.
- [62] Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW: **Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study.** J Comp Neurol 1990, **294**:76-95.
- [63] Rasia-Filho AA, Fabian C, Rigoti KM, Achaval M: **Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method.** Neuroscience 2004, **126**:839-847.
- [64] Hermel EE, Ilha J, Xavier LL, Rasia-Filho AA, Achaval M: **Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats.** Neurosci Lett 2006, **405**:153-158.
- [65] Cunningham RL, Clairborne BJ, McGinnis MY: **Pubertal exposure to anabolic androgenic steroids increases spine densities on neurons in the limbic system of male rats.** Neuroscience 2007, **150**: 609-615.
- [66] Isoardi NA, Bertotto ME, Martijena ID, Molina VA, Carrer HF: **Lack of feedback inhibition on rat basolateral amygdala following stress or withdrawal from sedative-hypnotic drugs.** Eur J Neurosci 2007, **26**:1036-1044.

Figura 1

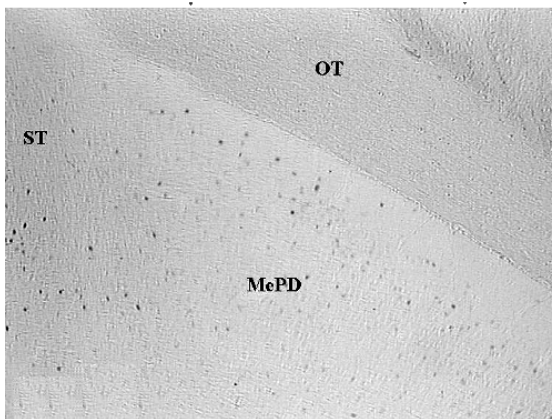
A



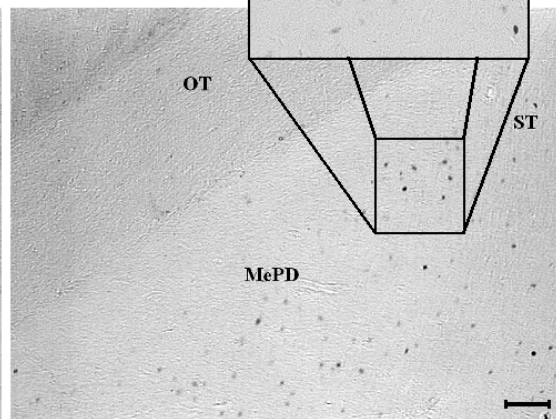
B



C

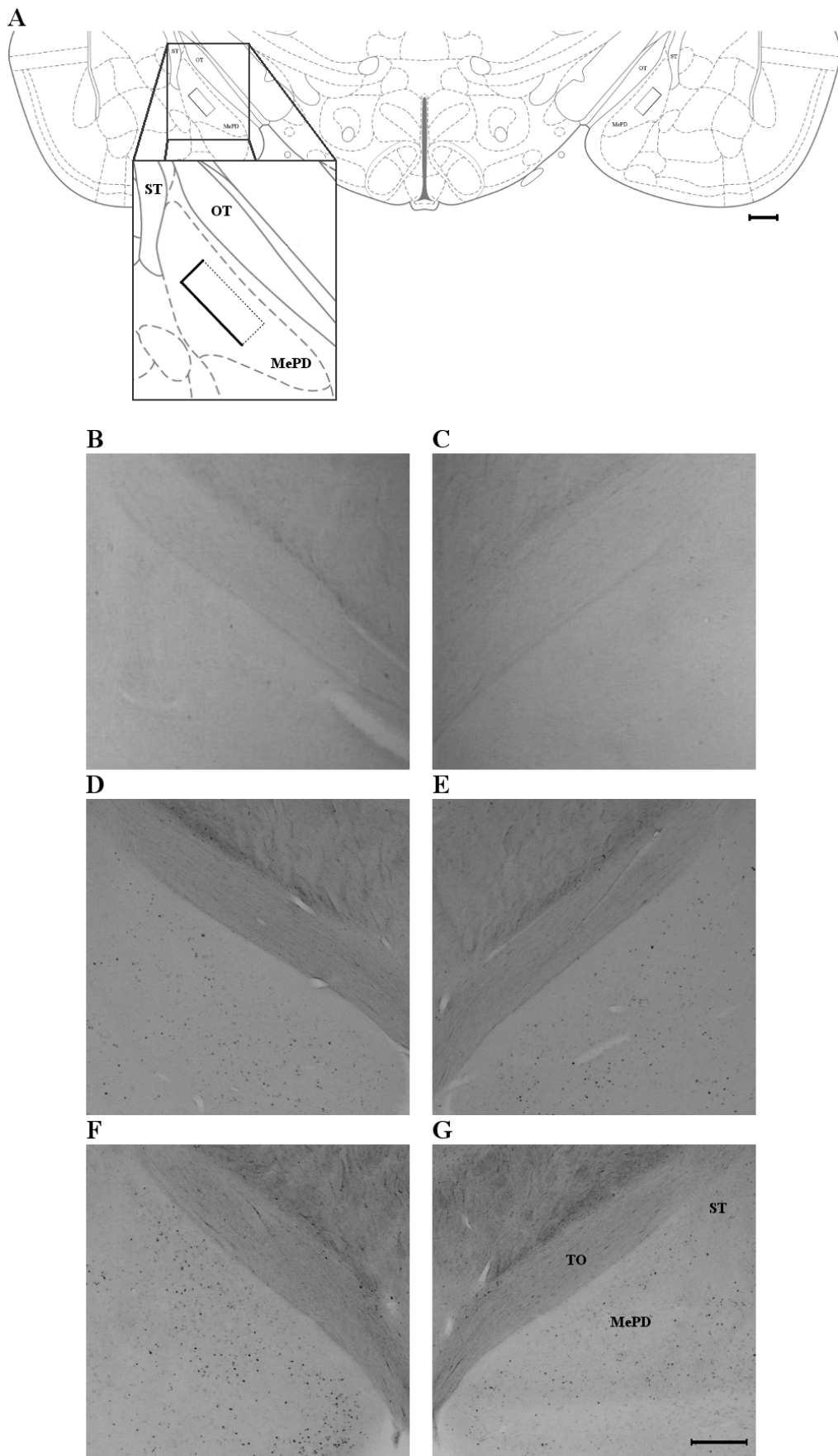


D



**Figura 1. A.** Coloração com Cresil Violeta de um corte coronal de cérebro de rato mostrando a localização ventral do trato óptico (OT) e a estria terminal (ST), que formam os limites lateral e superior da amígdala medial pósterodorsal (MePD), aproximadamente 3,3 mm posterior ao bregma. **B.** Diagrama esquemático de um corte coronal cerebral mostrando a MePD direita e esquerda e dois retângulos que compuseram a área de interesse onde foram contadas as células imunorreativas à proteína Fos no grupo “luta” de cada hemisfério. Adaptado do atlas de Paxinos e Watson (1998). Barra de escala = 1 mm. **C e D.** Imagens microscópicas digitalizadas mostrando evidentes corpos celulares imunorreativos à proteína Fos (pontos escuros) dentro da MePD direita e esquerda, respectivamente, de um rato do grupo “luta”. Somente o contraste foi ajustado. Barra de escala = 100 µm.

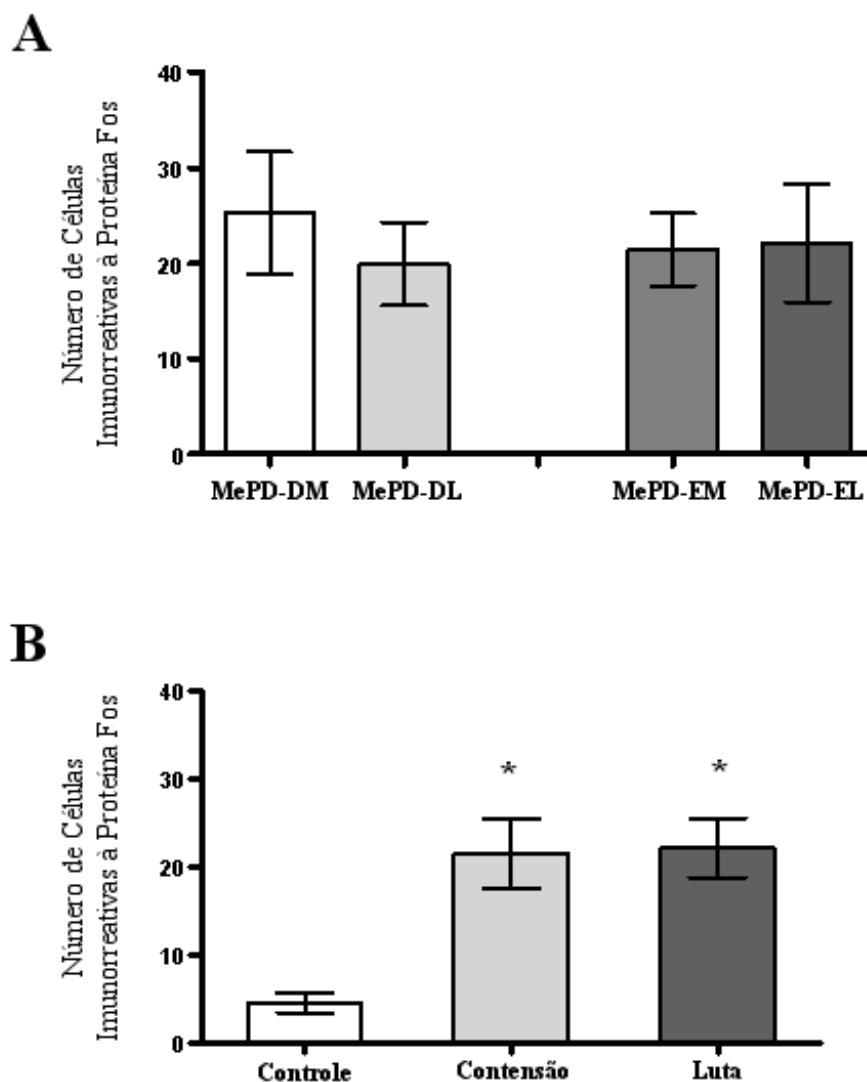
Figura 2





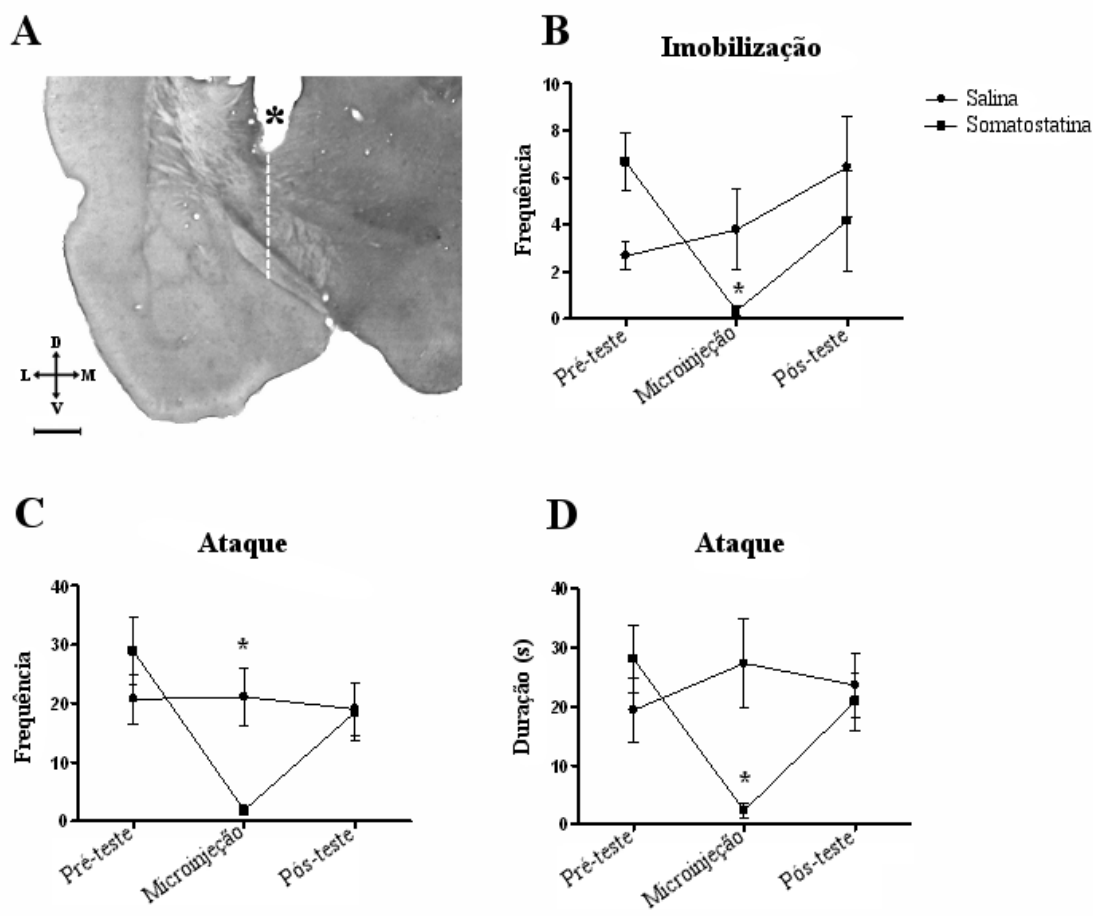
**Figura 2. A.** Diagrama esquemático de um corte coronal de cérebro de rato mostrando a MePD direita e esquerda e o retângulo que representou a área de interesse onde células imunorreativas à proteína Fos foram contadas nos grupos experimentais “controle”, “contenção” e “luta” em cada hemisfério cerebral. Adaptado a partir do atlas de Paxinos e Watson (1998). Barra de escala = 1 mm. **B-G.** Imagens microscópicas digitalizadas mostrando resultados representativos à imunoreatividade à proteína Fos na MePD direita e esquerda de ratos dos grupos “controle” (**B** e **C**, respectivamente), “contenção” (**D** e **E**, respectivamente) e “luta” (**F** e **G**, respectivamente). Em **G** observam-se os bordos tracejados que compõem os limites da MePD. Somente o contraste de fundo foi ajustado. Barra de escala = 250  $\mu$ m.

Figura 3



**Figura 3. A.** Média ( $\pm$  E.P.M) do número de células imunorreativas à proteína Fos na amígdala medial pósterodorsal direita, porção medial (MePD-DM) e lateral (MePD-DL), e a amígdala medial pósterodorsal esquerda, porções medial (MePD-EM) e lateral (MePD-EL), de ratos residentes submetidos a um encontro agressivo com um rato intruso (grupo “luta”). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quanto a lateralidade hemisférica ou nas porções da MePD desse grupo ( $p > 0,05$ ). **B.** Média ( $\pm$  E.P.M) do número de células imunorreativas à proteína Fos na MePD (dados de ambos os hemisférios direito e esquerdo foram analisados juntos) contadas nos grupos experimentais “controle”, “contensão” e “luta”. \*  $p < 0,05$  quando comparados ao grupo “controle”.

Figura 4



**Figura 4.** **A.** Fotomicrografia representativa de um corte de cérebro de rato mostrando a localização da implantação da cânula que encontra-se acima da amígdala medial pôsterodorsal (MePD) de ratos. As linhas tracejadas representam o curso da agulha de microinjeção, o que provocou uma pequena lesão mecânica (detalhes não mostrados). Barra de escala = 1.5 mm. **B-D.** Média ( $\pm$  E.P.M) da frequência do comportamento de imobilização (**B**), frequência de ataques (**C**) e duração de ataques (em segundos) (**D**) realizados pelo rato residente contra o rato intruso durante um encontro agressivo anterior a cirurgia estereotáxica (pré-teste, dados controle), no dia experimental da microinjeção de salina (0,3  $\mu$ l) ou somatostatina (1  $\mu$ M/0,3  $\mu$ l) na MePD e no dia seguinte após o dia da microinjeção (pós-teste, dados controle). \*  $p > 0,05$  quando comparados aos dados controles do mesmo grupo e da microinjeção de salina.

**Tabela 1:** Resultados referentes à frequência e duração dos comportamentos de investigação social e deambulação

	Grupo Controle		Grupo Somatostatina	
	Frequência	Duração (s)	Frequência	Duração (s)
<b>Pré-teste (DE 9)</b>				
Investigação Social	33,7 ± 4,2	136,5 ± 31,6	30,6 ± 6,6	111,3 ± 25,4
Deambulação	45,9 ± 4,7	57,70 ± 5,0	43,7 ± 4,6	97,4 ± 21,6
<b>Microinjeção (DE 14)</b>				
Investigação Social	39,3 ± 5,8	156,4 ± 58,5	19,8 ± 3,1	109,8 ± 30,3
Deambulação	51,6 ± 5,2	65,8 ± 8,4	41,83 ± 6,4	174,6 ± 40,9
<b>Pós-teste (DE 15)</b>				
Investigação Social	33,2 ± 6,6	85,4 ± 11,8	25,8 ± 5,5	95,3 ± 16,1
Deambulação	39,1 ± 3,0	61,8 ± 4,2	38,3 ± 5,6	67,0 ± 10,1

**Tabela 1.** Média ( $\pm$  E.P.M.) de frequência e duração (em segundos) dos comportamentos de investigação social e deambulação realizados pelo rato residente contra o rato intruso durante o encontro agressivo antes da cirurgia estereotáxica (pré-teste, dados controle) no dia experimental (DE 7 e 9), no dia experimental da microinjeção de salina (0,3  $\mu$ l) ou de somatostatina (1  $\mu$ M/0,3  $\mu$ l; no DE 14) na MePD, e no dia seguinte ao dia experimental da microinjeção (pós-teste, dados controle, no DE 15). Não foram encontrados dados estatisticamente significativos entre estes parâmetros comportamentais ( $p > 0,05$ ).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente protocolo experimental aplicado em ratos machos adultos *Wistar* mantidos inicialmente em condições padrão de biotério foi capaz de induzir comportamento agressivo nesses animais e pode ser considerado como metodologia adicional para futuros experimentos.

A MePD está envolvida no circuito neuronal que modula e desencadeia comportamentos agressivos e de estresse e/ou memória condicionada, como o depreendido pela expressão da proteína Fos após o emprego do presente protocolo experimental.

A somatostatina, quando microinjetada unilateralmente na MePD na dose de 1  $\mu\text{M}$ , apresenta efeito inibitório sobre o comportamento agressivo de ratos sem alterar seu comportamento de deambulação.

**DESENHO EXPERIMENTAL: IMUNOISTOQUÍMICA DE DETECÇÃO DA  
PROTEÍNA FOS**



**GRUPO "LUTA"**

- É ISOLADO POR 7 DIAS
- DE 7 E 9 PASSA POR ENCONTROS AGRESSIVOS COM 1 RATO INTRUSO
- DE 14: É CONTIDO E EXPOSTO A UM NOVO ENCONTRO AGRESSIVO COM 1 RATO INTRUSO
- +  
PERFUSÃO PARA COLETA DO ENCÉFALO PARA IMUNOISTOQUÍMICA



**GRUPO "CONTENÇÃO"**

- É ISOLADO POR 7 DIAS
- DE 7 E 9 PASSA POR ENCONTROS AGRESSIVOS COM 1 RATO INTRUSO
- DE 14: É CONTIDO
- +  
PERFUSÃO PARA COLETA DO ENCÉFALO PARA IMUNOISTOQUÍMICA

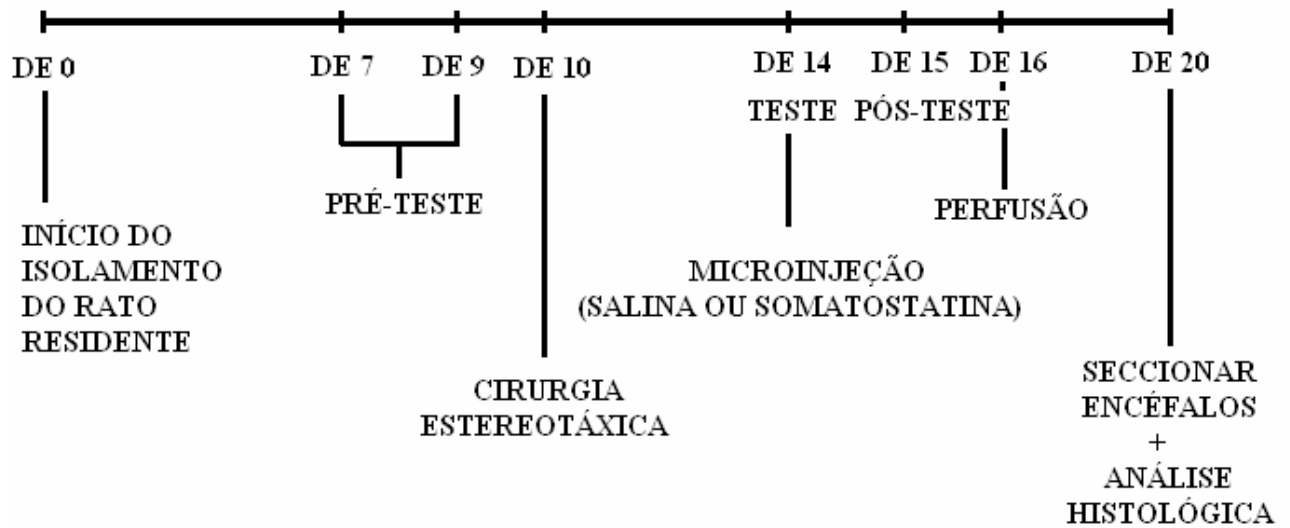


**GRUPO "CONTROLE"**

- É MANTIDO ISOLADO POR 14 DIAS SEM MANIPULAÇÃO
- DE 14: PERFUSÃO PARA COLETA DO ENCÉFALO PARA IMUNOISTOQUÍMICA

## DESENHO EXPERIMENTAL: MICROINJEÇÃO NA MePD

(SOMATOSTATINA E SALINA)



## **PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS**

Este trabalho foi apresentado nos seguintes locais:

- 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e 14º Congresso de Pesquisa e Desenvolvimento em Saúde do Mercosul no formato pôster. Porto Alegre, RS, Brasil;

- II Semana Científica da FFFCMPA, em 25 de setembro de 2007, na forma de tema livre. Porto Alegre, RS, Brasil;

- Prêmio de Menção Honrosa na II Semana Científica da FFFCMPA, em 25 de setembro de 2007. Porto Alegre, RS, Brasil;

- I Semana Científica da UFCSPA, em 15 de outubro de 2008, na forma de tema livre. Porto Alegre, RS, Brasil;

- XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental -FeSBE, em agosto de 2008, na forma de pôster. Águas de Lindóia, SP, Brasil;

- I IBRO/LARC Congress of Neurosciences of Latin América, The Caribbean and Iberian Península, em 1 à 4 de setembro de 2008, na forma de pôster. Búzios, RJ, Brasil.

- II Semana Científica da UFCSPA, em outubro de 2009, na forma de tema livre. Porto Alegre, RS, Brasil.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)