

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

JOÃO GUILHERME TASSONI BORTOLOCI

**Projeções hipotalâmicas para a substância cinzenta periaquedutal
envolvidas na organização da defesa social**

São Paulo
2024

JOÃO GUILHERME TASSONI BORTOLOCI

Projeções hipotalâmicas para a substância cinzenta periaquedutal envolvidas
na organização da defesa social

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Anatomia.

Orientadora: Simone Cristina Motta.

São Paulo
2024

Ficha Catalográfica:

**CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo**

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Tassoni Bortoloci, João Guilherme

Projeções hipotalâmicas para a substância cinzenta periaquedutal envolvidas na organização da defesa social / João Guilherme Tassoni Bortoloci; orientadora Simone Cristina Motta. -- São Paulo, 2023.

77 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. matéria cinzenta periaquedutal. 2. núcleo ventromedial do hipotálamo. 3. núcleo pré-mamilar do hipotálamo. 4. comportamento defensivo social. I. Motta, Simone Cristina, orientador. II. Título.

Formulário para assinatura da Comissão Julgadora:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): João Guilherme Tassoni Bortoloci

Titulo da Dissertação/Tese: Projeções Hipotalâmicas para a Substância Cinzenta Periaquedutal envolvidas na organização da defesa social.

Orientadora: Simone Cristina Motta.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Parecer da Comissão de Ética:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Projeções hipotalâmicas para a substância cinzenta periaquedutal envolvidas na organização da defesa social", protocolada sob o CEUA nº 9782090821 (ID 002191), sob a responsabilidade de **Simone Cristina Motta** e equipe; *João Guilherme Tassoni Bortoloci* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 22/09/2021.

We certify that the proposal "Hypothalamic - Periaqueductal Gray projections recruited during social defense.", utilizing 170 Genetically modified mice (GMO) (170 males), 150 Isogenics mice (150 males), 30 Heterogenics mice (15 males and 15 females), protocol number CEUA 9782090821 (ID 002191), under the responsibility of **Simone Cristina Motta and team; João Guilherme Tassoni Bortoloci** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 09/22/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 09/2021 a 09/2025 (48 meses) Área: Anatomia

Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Peso ou idade:	10 a 20 semanas N: 120
Linhagem:	VglutCRE				
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Peso ou idade:	10 a 20 semanas N: 50
Linhagem:	VgatCRE				
Origem:	Biotério Central FMUSP				
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	Peso ou idade:	10 a 20 semanas N: 150
Linhagem:	C57BL/6				
Origem:	Biotério do Departamento de Farmacologia ICB - Unidade I				
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos	Peso ou idade:	10 a 20 semanas N: 15
Linhagem:	Swiss				
Origem:	Biotério do Departamento de Farmacologia ICB - Unidade I				
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	Peso ou idade:	10 a 20 semanas N: 15
Linhagem:	Swiss				

São Paulo, 09 de dezembro de 2023





Instituto
de Ciências
Biomédicas

Excelência em Ensino e Pesquisa

Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Fran

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Instituto
de Ciências
Biomédicas

Excelência em Ensino e Pesquisa



Dedicatória:

Dedico este trabalho a toda minha família, especialmente meus pais que sempre me apoiaram e incentivaram no caminho da educação e persistência e especialmente minha noiva e filha pela paciência, compreensão e apoio à todo esforço que direcionei ao trabalho.

Dedico o trabalho também a todos os professores, do ensino básico, graduação e pós-graduação que contribuíram no processo de construção de minha formação.

Agradecimentos:

A toda minha família, especialmente noiva e filha, pela paciência e amor durante o processo.

A todo apoio, conhecimento, atenção e acolhimento recebido de minha orientadora Professora Dra. Simone Cristina Motta e por ser uma referência em comportamento defensivo e neuroanatomia com quem tive o privilégio de aprender.

Aos Professores Dr. Antônio de Pádua Carobrez e Dr. Newton Sabino Canteras que são referências no estudo do comportamento defensivo.

A toda a banca examinadora e suplente que se disponibilizou a participar deste processo e contribuir com a avaliação e melhoria deste trabalho.

A todo o Laboratório de Neuroanatomia Funcional que me ajudaram e participaram deste processo.

A todos os funcionários do ICB-III que indiretamente contribuíram com este trabalho que dependeu de segurança da instalação, manutenção e fornecimento de animais.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Resumo:

Comportamentos defensivos sociais são expressos em resposta a uma ameaça proveniente de um coespecífico, como reproduzido no paradigma residente-intruso. Nesta situação, os comportamentos defensivos emitidos durante o ataque direto do residente são chamados de ativos. Quando ratos sustentam posturas defensivas sem estar sofrendo um ataque, esses comportamentos defensivos são chamados de passivos. Conforme demonstrado em estudos prévios, os núcleos pré-mamilar dorsal (PMd) e porção ventrolateral do núcleo ventromedial (VMHvl) participam da organização dos comportamentos defensivos sociais (CDS). A estrutura chave na expressão do CDS é a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) que recebe projeções destes núcleos. Desta forma, o objetivo do trabalho consiste em explorar e descrever morfológicamente estas projeções em camundongos expostos ao paradigma residente-intruso e eferências da MCPdm. Para isso, foram utilizados camundongos C57BL/6 submetidos a depósitos iontoforéticos do traçador retrógrado Fluoro-Gold (FG) na MCPdm ou MCPI e que posteriormente foram submetidos ao paradigma residente-intruso como intrusos. Nestes animais, foram observadas células duplamente marcadas para o marcador de atividade neuronal, a proteína Fos, e para FG no VMHvl e PMd. Os resultados demonstram que parte substancial das projeções do núcleo PMd para a MCPdm ou MCPI e parte substancial das projeções do VMHvl para MCPdm ou MCPI estão ativas no CDS. Uma vez demonstrada a presença de projeções ativas em camundongos expostos ao paradigma residente intruso, novas vias neurais, estruturas e hipóteses poderão ser exploradas para que o circuito neural do CDS possa ser melhor compreendido.

Palavras-chave: matéria cinzenta periaquedutal (MCP), núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH), núcleo pré-mamilar do hipotálamo (PMd), comportamento defensivo social.

Abstract:

Social defensive behaviors are expressed in response from a conspecific threat as seen in the resident-intruder paradigm. Active defensive behaviors are expressed while the animal is under attack, and passive forms are defensive behaviors exhibited when the dominant is not attacking. As shown in previous studies, the dorsal premmillary nucleus (PMd) and the ventrolateral portion of the ventromedial nucleus (VMHvl) of the hypothalamus are part of the social defensive behaviors organization. The key structure responsible for organizing those behaviors is the periaqueductal gray matter (PAG) that receives projections from both nuclei. Taking this into account, the aim of this study is to explore and describe these projections in mice exposed to the resident-intruder paradigm as well as anterograde projections from dorsomedial PAG (PAGdm). To address this question, we used C57BL/6 mice which was submitted to previous iontophoretic deposits of Fluoro-Gold (FG) in the PAGdm or lateral PAG (PAGl). After that, the animals were submitted to the resident-intruder paradigm as intruders. Their brains were extracted and processed to observe double-stained cells for the neuronal activity marker, Fos protein and FG. The results showed that the double-stained cells were present in VMHvl and PMd, therefore demonstrating that substantial part of the projections from PMd nucleus projects to PAGdm and PAGl as well as VMHvl to PAGdm and PAGl. Once confirming the presence of active projections related to social defensive behaviors, new neural pathways, structures and hypotheses can be explored in order to further understand the neural pathway underlying social defensive behaviors.

Keywords: periaqueductal gray matter (PAG), ventromedial nucleus of hypothalamus (VMH), premmillary nucleus of hypothalamus (PMd), social defensive behavior.

Lista de Figuras:

Figura 1 - Fluxograma e representação esquemática da base neural dos CDS	28
Figura 2 - Representação esquemática do deslocamento de um intruso ou dominante.....	33
Figura 3 - Quantificação de células c-fos de estruturas hipotalâmicas	36
Figura 4 - Fotomicrografias de duplas marcações através de depósito na MCPdm.....	37
Figura 5 - Fotomicrografias de duplas marcações através de depósito na MCPI.....	39
Figura 6 - Diagrama de Venn sobre contabilização de neurônios através de depósito na MCPdm.....	41
Figura 7 - Diagrama de Venn sobre contabilização de neurônios através de depósito na MCPI.....	42
Figura 8 - Distribuição anteroposterior de neurônios no VMHvl	44
Figura 9 - Esquema da distribuição de neurônios no VMHvl	44
Figura 10 - Comportamentos defensivos sociais	45
Figura 11 - Comportamentos agressivos	46
Figura 12 - Deslocamento de intrusos	48
Figura 13 - Deslocamento de dominantes	49
Figura 14 - Deslocamento sobre diferentes métricas	50
Figura 15 - Correlação entre CDS passivo e células Fos no PMd	51
Figura 16 - Correlação entre congelamento e Fos no PMd, VMHvl, VMHc e PVH.....	52

Figura 17 - Correlação entre comportamento de fuga e Fos no PMd, VMHvl, VMHc.....	53
Figura 18 - Correlação entre ataques diretos do dominante, congelamento e comportamento de fuga	54
Figura 19 - Fotomicrografias de projeções anterógradas da MCPdm e colículo superior no bregma -1.06.....	56
Figura 20 - Fotomicrografias de projeções anterógradas da MCPdm e colículo superior no bregma -1.46 e -1.7.....	57
Figura 21 - Fotomicrografias de projeções anterógradas da MCPdm e colículo superior no bregma -3.88 e -4.36.....	58
Figura 22 - Fotomicrografias de projeções anterógradas da MCPdm e colículo superior no bregma -4.96 e -6.12.....	59
Figura 23 - Síntese da base neural do CDS adicionando a contribuição do trabalho.....	66
Figura 24 - Correlação de matrizes das variáveis observadas no trabalho destacando o coeficiente de correlação.....	79
Figura 25 - Correlação de matrizes das variáveis observadas no trabalho destacando valor p.....	81
Figura 26 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 1	82
Figura 27 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 2	83
Figura 28 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 3	84
Figura 29 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 4	85
Figura 30 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 5	86
Figura 31 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 6	87
Figura 32 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 7	88
Figura 33 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 8	89

Figura 34 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 9	90
Figura 35 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 10	91
Figura 36 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 11	92
Figura 37 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 12	93
Figura 38 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 13	94
Figura 39 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 14	95
Figura 40 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 15	96
Figura 41 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 16	97
Figura 42 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 17	98
Figura 43 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 18	99
Figura 44 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 19	100
Figura 45 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 20	101
Figura 46 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 21	102
Figura 47 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 22	103

Figura 48 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 23	104
Figura 49 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 24	105
Figura 50 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 25	106
Figura 51 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 26	107
Figura 52 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 27	108
Figura 53 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 28	109
Figura 54 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 29	110
Figura 55 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 30	111
Figura 56 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 31	112
Figura 57 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 32	113
Figura 58 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 33	114
Figura 59 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 34	115
Figura 60 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 35	116
Figura 61 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 36	117
Figura 62 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 37	118

Figura 63 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 38	119
Figura 64 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 39	120
Figura 65 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 40	121
Figura 66 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 41	122
Figura 67 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 42	123
Figura 68 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 43	124
Figura 69 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 44	125
Figura 70 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 45	126
Figura 71 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 46	127
Figura 72 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 47	128
Figura 73 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 48	129
Figura 74 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 49	130
Figura 75 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 50	131
Figura 76 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 51	132
Figura 77 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 52	133

Figura 78 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 53	134
Figura 79 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 54	135
Figura 80 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 55	136
Figura 81 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 56	137
Figura 82 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 57	138
Figura 83 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 58	139
Figura 84 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 59	140
Figura 85 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 60	141
Figura 86 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 61	142
Figura 87 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 62	143
Figura 88 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 63	144
Figura 89 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 64	145
Figura 90 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 65	146
Figura 91 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 66	147
Figura 92 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 67	148

Figura 93 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 68	149
Figura 94 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 69	150
Figura 95 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 70	151
Figura 96 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 71	152
Figura 97 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 72	153
Figura 98 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 73	154
Figura 99 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 74	155
Figura 100 - Correlação das variáveis do trabalho, parte 75	156
Figura 101 - Página 1 da publicação Failure of AAV retrograde tracer transduction in hypothalamic projections to the periaqueductal gray matter.....	157
Figura 102 - Página 2 da publicação Failure of AAV retrograde tracer transduction in hypothalamic projections to the periaqueductal gray matter.....	158
Figura 103 - Página 3 da publicação Failure of AAV retrograde tracer transduction in hypothalamic projections to the periaqueductal gray matter.....	159
Figura 104 - Página 4 da publicação Failure of AAV retrograde tracer transduction in hypothalamic projections to the periaqueductal gray matter.....	160
Figura 105 - Página 5 da publicação Failure of AAV retrograde tracer transduction in hypothalamic projections to the periaqueductal gray matter.....	161
Figura 106 - Página 6 da publicação Failure of AAV retrograde tracer transduction in hypothalamic projections to the periaqueductal gray matter.....	162

Lista de abreviaturas:

3V	terceiro ventrículo
AHN	núcleo anterior do hipotálamo
AP	anteroposterior
Aq	aqueduto
BNST	núcleo intersticial terminal
cAMP	AMP cíclico
CCK	colecistocinina
CDS	comportamento defensivo social
cFos	gene da proteína Fos
col	colículo superior
CRH	hormônio liberador de cortitrofina
CUN	núcleo cuneiforme
D3V	3° ventrículo dorsal
DA	área dorsal hipotalâmica
DAB	diaminobenzidina tetrahydroclorada
DM	núcleo dorsomedial do hipotálamo
DV	dorsoventral
Esr1	Receptor estrogênico
f	fornix
FG	Fluorogold
Fos	gene Fos
LHA	hipotálamo lateral
LHAjd	porção justodorsomedial do hipotálamo lateral
LHAjp	porção justoparaventricular do hipotálamo lateral
LHb	núcleo da habénula lateral
MCP	matéria cinzenta periaquedutal
MCPdm	coluna dorsomedial da matéria cinzenta periaquedutal
MCPI	coluna lateral da matéria cinzenta periaquedutal
MCPvl	coluna ventrolateral da matéria cinzenta periaquedutal

MEA	núcleo medial da amígdala
MEAad	porção anterodorsal do núcleo medial da amígdala
MEAav	porção anteroventral do núcleo medial da amígdala
MEApd	porção posterodorsal do núcleo medial da amígdala
MEApv	porção posteroventral do núcleo medial da amígdala
ML	mediolateral
mlf	fascículo medial longitudinal
MPO	núcleo pre-óptico medial
opt	trato óptico
OXT	oxitocina
PMd	núcleo pré-mamilar dorsal
PMv	núcleo pré-mamilar ventral
PV	núcleo paraventricular do tálamo
PVH	núcleo paraventricular do hipotálamo
SPFd	porção dorsal do núcleo subparafascicular
SSH	sistema septo-hipocampal
VMH	núcleo ventromedial do hipotálamo
VMHc	porção central do núcleo ventromedial do hipotálamo
VMHdm	porção dorsal do núcleo ventromedial do hipotálamo
VMHvl	porção ventrolateral do núcleo ventromedial do hipotálamo
ZI	zona incerta

Lista de Siglas

μL	microlitro
μm	micrometro
μA	microampère
mm	milímetro
pH	potencial hidrogeniônico
M	concentração Molar
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
σ	desvio padrão
n	tamanho amostral
R	coeficiente de correlação
p	probabilidade de significância
D	deslocamento

Lista de Tabelas:

Tabela 1	Descrição dos grupos e procedimentos realizados.....	30
Tabela 2	Grupos experimentais realizados.....	30
Tabela 3	Contagem de populações neurais nas estruturas chaves considerando depósito na MCPdm.....	41
Tabela 4	Contagem de populações neurais nas estruturas chaves considerando depósito na MCPI.....	42
Tabela 5	Projeções anterógradas da MCPdm.....	55

Sumário:

1	Introdução.....	22
1.1	Os comportamentos cooperativos e o convívio coletivo.....	22
1.2	Os atritos gerados pelo convívio coletivo e os comportamentos defensivos sociais.....	22
1.3	A base neural dos CDS.....	25
1.4	Objetivo e objetivos específicos.....	29
1.5	Grupos experimentais.....	29
2	Metodologia.....	30
2.1	Grupos e abordagens experimentais.....	30
2.2	Animais.....	31
2.3	Cirurgia estereotáxica.....	31
2.4	Paradigma Residente-Intruso(Miczek, 1979).....	32
2.5	Análise Comportamental.....	32
2.6	Perfusão.....	33
2.7	Microtomia.....	33
2.8	Reações Imunohistoquímicas.....	34
2.9	Distribuição de células no eixo anteroposterior.....	35
2.10	Contagem de células.....	35
2.11	Análise estatística e softwares utilizados.....	35
3	Resultados.....	35
3.1	Duplas marcações de FG e Fos no PMd e VMH e os CDS.....	35
3.2	Projeções anterógradas da MCPdm.....	54
4	Discussão.....	59
5	Conclusão.....	67
	Referências.....	68
	Anexo 1.....	79
	Anexo 2.....	157

1.Introdução:

1.1- Os comportamentos cooperativos e o convívio coletivo.

Os comportamentos cooperativos ocorrem quando indivíduos coordenam suas ações para a produção de resultados benéficos entre si (Duguid; Melis 2020). Várias espécies animais, como abelhas, formigas, vespas (Helanterä; Kulmuni; Pamilo 2016), flamingos, zebras e elefantes são capazes de realizar tais comportamentos (Rubenstein; Kealey, 2010) propiciando a formação de grupos e até mesmo sociedades bastante complexas como no caso dos primatas (Beisner et al. 2016).

O convívio coletivo oferta vantagens para os indivíduos de uma espécie devido aos comportamentos cooperativos. Essas vantagens incluem proteção contra predadores, manutenção térmica, melhor controle de ectoparasitas, caça em bando, compartilhamento de comida, defesa do território, maior disponibilidade de parceiras(os) sexuais, defesa da prole, entre outros benefícios (Rubenstein; Kealey, 2010, Cheney 2011, Swedell 2012, Olson et al., 2013, Duguid; Melis, 2020).

O rato, comumente utilizado em laboratório (*Rattus norvegicus*), quando livre na natureza, pode chegar a formar colônias com mais de 300 indivíduos. Essas colônias ficam organizadas em túneis e câmaras coletivamente escavadas no solo, onde fêmeas podem dar à luz e criar novas gerações com maior segurança. O convívio coletivo também fornece melhor manutenção térmica além do compartilhamento de comida e informações entre os indivíduos (Schweinfurth 2020).

1.2 – Os atritos gerados pelo convívio coletivo e os comportamentos defensivos sociais:

Da mesma forma que os comportamentos cooperativos atraem os indivíduos ao convívio, tal proximidade também gera adversidades (Rubenstein; Kealey, 2010, Lee et al. 2019). Estas adversidades incluem o maior risco de transmissão de doenças e a competição por objetos de interesse como: dominância, alimentos, território e potenciais parceiros sexuais (Swedell 2012, Lee et al. 2019).

Em roedores, essa competição ocorre, principalmente entre machos, que realizam ataques uns contra os outros com o intuito de obter estes objetos de interesse. Aquele que demonstrar maior força e habilidade dominará o outro, assumirá a postura de dominante e aquele que exibir comportamentos defensivos, a fim de minimizar ataques do oponente, assumirá a posição de subordinado. Desta forma, encontros futuros tenderão a manter a hierarquia do dominante sobre o subordinado (hierarquia dominante-subordinado) evitando novas disputas (Martinez; Calvo-Torrent.; Herbert, 2002, Diaz; Lin, 2020).

Os comportamentos defensivos sociais (CDS) usados por roedores no estabelecimento da relação dominante-subordinado são replicáveis em condições experimentais e conhecidas como paradigma residente-intruso (Miczek, 1979). Neste paradigma, ratos dominantes exibem ataques contra ratos subordinados que exibem CDS em resposta. Estes comportamentos são caracterizados como a postura *up-right*, quando usam as patas dianteiras em posição ereta para manter o subordinado afastado e congelamento quando distantes do dominante. A exposição do ventre com a proteção das costas em postura de submissão total é realizada pelo fato de dominantes evitarem realizar ataques contra o ventre dos intrusos (Blanchard; Blanchard, 1977).

Os CDS podem ser divididos em dois grupos: os CDS ativos (como fuga e *up-right*), ou seja, aqueles realizados quando sob ataque direto do dominante e os CDS passivos (congelamento ou *crouch-sniff*), realizados sem o ataque direto do dominante. Em estudo prévio, foi constatado que ratos passam 90% do tempo exibindo CDS, sendo estes 75% do tempo em CDS passivos e 15% em CDS ativos (Motta et al., 2009).

Como descrito o encontro entre um dominante e um subordinado em estudo anterior (Blanchard; Blanchard 1988, tradução nossa):

No ataque realizado por ratos contra coespecíficos, é característico que o dominante do grupo direcione os ataques contra subordinados ou intrusos machos do grupo. No caso de uma interação residente-intruso, o dominante cheira a região perianal do intruso, e em sequência tem seus pelos eriçados, que resulta na aparência de um animal maior. O residente persegue o intruso e se o intruso permanecer em postura *up-right*, o dominante ataca lateralmente, e se o intruso

permanecer deitado com o dorso para o chão, o dominante permanece sobre o intruso. Os ataques através de mordidas são direcionados para o dorso do intruso. Em defesa aos ataques, o intruso pode fugir, permanecer em pé com as patas dianteiras estendidas contra o dominante para empurrar-lo ou rolar para atrás em uma posição supina. Enquanto recebe as mordidas, ou imediatamente após recebê-las, o intruso pode realizar mordidas retaliatórias contra o dominante na região do focinho. Durante os intervalos do ataque, o intruso tende a realizar o comportamento de congelamento.

Entre os vários comportamentos agressivos descritos acima, todos possuem uma ação direta do dominante sobre o intruso e que possuem uma reação do subordinado, a qual podemos chamar de ativa. No momento em que o dominante cessa os ataques, comumente associado ao cansaço físico, o comportamento esperado do subordinado é o congelamento, que podemos chamar de passivo, uma vez que o dominante não realiza uma ação direta e com contato físico sobre o intruso. Desta forma, a expressão de comportamentos defensivos passivos evita o retorno dos ataques, preservando o intruso. Dessa forma, a separação dos comportamentos defensivos sociais em passivos e ativos, não está relacionada à reação defensiva do subordinado em si, mas no comportamento agressivo direto ou indireto realizado pelo dominante e que desencadeia comportamentos defensivos organizados em ativos ou passivos (Motta et al., 2009).

Os comportamentos defensivos sociais, podem ser estudados de diversas formas em relação ao tempo. Tanto de forma aguda, como utilizada aqui neste trabalho como de forma crônica, para entender as modificações encefálicas e comportamentais geradas através da repetição do estímulo (de Almeida; Baldo; Motta 2022), assim como para gerar um estímulo estressor repetitivo, à fim de estudar o efeito do estresse-crônico no subordinado e que é muito comum em estudos que almejam entender mecanismos neurais básicos relacionados a desordens de humor em humanos (Patel et al. 2019).

Um exemplo do efeito da repetição do protocolo, é observando quando camundongos expostos três vezes ao paradigma residente-intruso, comparados à camundongos expostos apenas uma vez, apresentam aumento de defesa

passiva, e alteração da expressão de c-fos em certas estruturas (de Almeida; Baldo; Motta 2022).

1.3 – A base neural dos CDS:

Os genes de expressão imediata codificam fatores transcricionais em resposta a diversos estímulos. Em neurônios, c-fos representa um destes genes. Quando sofrem potenciais de ação, levam ao aumento intracelular de Ca^{+2} e cAMP que são importantes fatores para a sua transcrição (Lyons; West, 2011). Desta forma, a detecção da proteína Fos pode ser utilizada como um marcador indireto de atividade neural de qualquer natureza, incluindo atividade neural relativa à expressão de CDS (Martinez; Calvo-Torrent; Herbert, 2002). Muitas estruturas encefálicas de subordinados apresentam elevada expressão de proteína Fos após passarem pelo paradigma residente-intruso. Estruturas como os núcleos paraventricular (PVH), ventromedial (VMH) e pré-mamilar dorsal (PMd) do hipotálamo se destacam assim como a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) no mesencéfalo, entre outras (Martinez; Calvo-Torrent; Herbert, 2002; Motta et al., 2009; Motta, Canteras, 2015; de Almeida et al., 2023).

O circuito responsável pela expressão do CDS é recrutado quando receptores no órgão vomeronasal detectam feromônios e estimulam neurônios do bulbo olfatório acessório, que por sua vez, ativam neurônios do núcleo Medial da Amígdala (MEA), alterando o funcionamento desta estrutura dependendo da pista social apresentada (Li et al., 2017). O MEA apresenta subdivisões, sendo elas as porções anteroventral (MEAav), anterodorsal (MEAad), posterodorsal (MEApd), e posteroventral (MEApv), que enviam projeções para o hipotálamo e outras estruturas (Canteras; Simerly; Swanson, 1995). Preferencialmente, o MEAad e MEApd enviam projeções para o circuito sexualmente dimórfico. Este circuito foi descrito através de estudos de hibridização *in situ* para receptores androgênicos e estrogênicos encefálicos (Simerly et al. 1990). Localizado na zona medial do hipotálamo, o circuito é composto pelos núcleos preóptico medial (MPO), VMHvl e Pré-Mamilar Ventral (PMv) e caracterizado por possuir conexões bidirecionais entre seus núcleos (Simerly et al. 1990, Canteras; Swanson, 1992, Canteras; Simerly; Swanson, 1994).

Em estudo em camundongos, foi observada expressão preferencial de Fos no VMHvl em intrusos expostos ao paradigma residente-intruso (Wang et al., 2019a). Também já foi observado que a inibição optogenética de neurônios Esr1+ bilateral do VMHvl causa a redução da expressão de CDS, assim como a estimulação causa aumento da expressão de CDS. Sabe-se também que os neurônios Esr1+ da porção anterior do VMHvl projeta-se para áreas como o PVH, a coluna dorsomedial (MCPdm) e a coluna lateral da (MCPI) da MCP, entre outras estruturas (Wang et al., 2019a).

Outra estrutura chave na organização dos CDS é o núcleo PMd. Em ratos, Motta e colaboradores (2009) observaram que a lesão citotóxica do núcleo PMd causa abrupta redução na expressão dos CDS passivos no paradigma residente-intruso. Também observaram que a expressão de Fos foi preferencialmente localizada na porção dorsomedial do PMd de intrusos quando submetidos ao paradigma residente-intruso, além de, nesta porção, também observarem projeção preferencial a MCPdm e MCPI (Motta et al., 2009). Em experimentos comparando o paradigma residente-intruso ao estresse de imobilização e utilizando marcações para c-fos, Motta e Canteras (2015) observaram similaridades entre as bases neurais recrutadas nos protocolos experimentais. Estas similaridades foram observadas no PMd e nas áreas justodorsomedial (LHAjd) e justoparaventricular (LHAjp) da área lateral hipotalâmica demonstrando como o encerramento gerado no paradigma residente-intruso se manifesta no protocolo. A ativação observada pode ser gerada pelas *boundary vector cells* que processam a sinalização do encerramento no hipocampo e que, através do sistema septo-hipocampal (SSH), ativam o LHAjd e a LHAjp que por sua vez ativam o PMd (Motta; Canteras 2015).

A MCP, localizada no mesencéfalo, está relacionada com a expressão de comportamentos defensivos de várias naturezas como o anti-predatório, o social e o anti-nociceptivo, além de outras funções (Gross; Canteras, 2012). Foi observado que a MCPdm e MCPI apresentam expressão elevada de Fos em subordinados submetidos ao paradigma residente-intruso (Motta et al., 2009). Outra subdivisão da MCP relevante para a expressão de comportamentos defensivos é a MCPvl, crucial para a expressão do comportamento de

congelamento (Tovote et al., 2016, Rufino et al., 2019), frequentemente realizado pelo subordinado no paradigma residente-intruso (Blanchard; Blanchard, 1977).

A MCPI apresenta papel na expressão de comportamentos de caça (Li et al. 2018, Marín-Blasco et al. 2020) e defesa (Li et al. 2018, Wang et al. 2019b, Marín-Blasco et al. 2020, Assareh et al. 2016). A estimulação optogenética da MCPI pode induzir tanto o comportamento de congelamento quanto de fuga, mas quando em alta intensidade e com apenas uma repetição, induz fuga (Assareh et al. 2016). Outros estudos trabalhando com a estimulação optogenética de projeções glutamatérgicas do cortex auditivo e LHA para a MCPI demonstraram expressão de comportamentos de fuga (Wang et al. 2019b, Li et al. 2018). Ainda, a estimulação optogenética de neurônios glutamatérgicos da MCPdl e MCPI auxiliam na expressão do comportamento de fuga, inibindo o comportamento de congelamento, estimulando neurônios gabaérgicos da MCPvl que por sua vez inibem neurônios glutamatérgicos envolvidos no comportamento de congelamento (Tovote et al. 2016).

Apesar de os neurônios da MCPI responderem tanto à defesa social quanto a comportamentos de caça, um experimento demonstrou que existem populações neurais na MCPI que, em grande parte, estão funcionalmente segregadas em aspectos de organização dos comportamentos defensivos sociais e de caça (Marín-Blasco et al. 2020).

Estudos que buscam esclarecer as funções da MCPdm são raros na literatura. A maior parte estuda a MCPdm e MCPdl juntas como MCP dorsal (Deng; Xiao; Wang 2016, Reis, et al., 2021, Liu et al. 2022, Tsang et al., 2023). Nestes estudos, sabe-se que a estimulação optogenética da estrutura induz a expressão de avaliação de risco, congelamento e fuga (Deng; Xiao; Wang 2016, Tsang et al. 2023). Uma possível eferência da MCP dorsal durante comportamentos defensivos poderia ser sua projeção para o núcleo cuneiforme (CUN), uma vez que foi demonstrado que o estímulo desta projeção induz comportamentos defensivos (Bindi et al., 2023, Tsang et al. 2023). Recentemente, foi descrito que a lesão citotóxica da MCPdm em ratos expostos à coespecíficos agressores praticamente abole a expressão de CDS passivos e gera aumento na expressão de CDS ativos assim como reduz a expressão de Fos no PMd, demonstrando que a sinalização na MCPdm retorna para o PMd,

possivelmente, através de projeções ascendentes da MCPdm e CUN para o LHAjd e LHAjp (de Almeida et al., 2023).

A MCPvl também está envolvida no controle da dor através de projeções para a porção rostral-ventromedial da medula e corno dorsal da medula espinal (Lloyd; Murphy, 2009) assim como através de neurônios dopaminérgicos para o núcleo intersticial terminal (BNST) (Yu et al., 2021). A dor é um elemento presente no paradigma-residente intruso, uma vez que o dominante realiza mordidas no intruso, desta forma, sendo válido ressaltar o papel da MCP neste aspecto. Vale ressaltar também, que a MCPvl recebe projeções da MCPdm (de Almeida et al. 2023).

A figura 1, abaixo, sintetiza e organiza a maior parte do que conhecemos até o momento sobre a base neural do CDS.

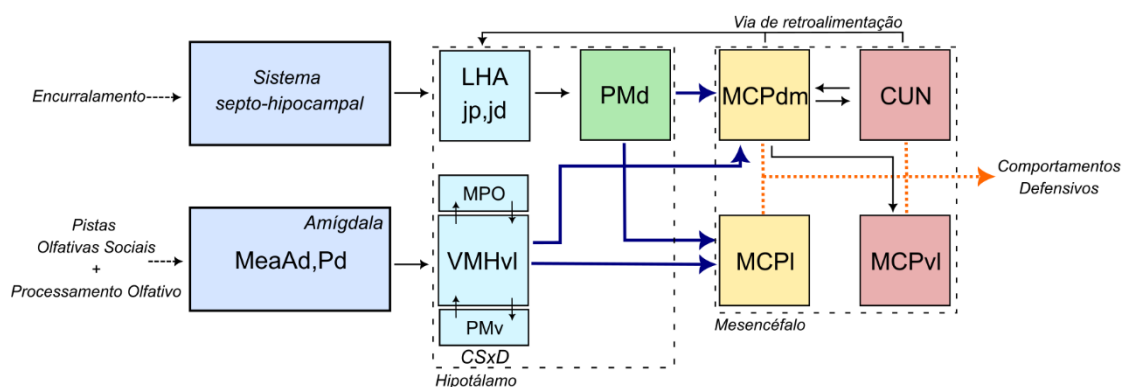


Figura 1: Fluxograma e representação esquemática da base neural dos CDS. O coespecífico dominante exerce sobre o intruso estímulos como pistas olfativas sociais (POS), além do encurralamento. As POS são processadas pelo órgão vomeronasal do subordinado (OV) que por sua vez estimulam neurônios no bulbo acessório olfativo (BAO), resultando no processamento olfativo. O encurralamento é processado no sistema septo-hipocampal (SSH). O SSH possui projeções para o hipotálamo lateral, porções justaparaventricular (LHAjp) e justadorsomedial (LHAjd) que ativam o PMd. O processamento olfativo estimula MEA, sendo as porções anterodorsal(ad) e anteroposterior(ap) aquelas que estimulam o circuito sexualmente dimórfico (CSxD). Por sua vez, os núcleos VMHvl e PMd enviam projeções para a MCPdm e MCPI. A MCPdm envia projeções para o núcleo Cuneiforme (CUN) e ambas as estruturas enviam projeções para o LHA formando a via de retroalimentação. A MCPdm também envia projeções para a MCPvl. Juntas, a MCPdm, MCPI, MCPvl e CUN organizam os comportamentos defensivos. A figura foi modificada a partir de Almeida e colaboradores (2023) e Motta e colaboradores (2009). [la1]

Considerando todas as vias descritas acima neste tópico, e o fato que a lesão citotóxica do PMd reduz a expressão de CDS passivos (Motta et al. 2009), assim como a porção anterior do VMHvl (aVMHvl) influencia a expressão de CDS (Wang et al. 2019) e que ambas as estruturas se projetam para a MCPdm e MCPI, o objetivo deste trabalho consiste em descrever morfológicamente as projeções dos núcleos PMd e VMHvl para as colunas MCPdm e MCPI em camundongos expostos ao paradigma-residente intruso e avaliar as projeções anterógradas da MCPdm.

1.4 – Objetivo e objetivos específicos:

O objetivo deste trabalho é descrever morfológicamente as projeções do VMHvl e do PMd para a MCP durante mobilização do CDS. Para isto, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- 1 – Descrever morfológicamente a projeção do PMd para a MCPdm durante ativação gerada no CDS.
- 2 – Descrever morfológicamente a projeção do PMd para a MCPI durante ativação gerada no CDS.
- 3 – Descrever morfológicamente a projeção do VMHvl para a MCPdm durante ativação gerada no CDS.
- 4 – Descrever morfológicamente a projeção do VMHvl para a MCPI durante ativação gerada no CDS.
- 5 – Descrever morfológicamente as eferências da MCPdm.

1.5 – Grupos experimentais:

- 1 – Para explorar os objetivos 1 e 3, foram utilizados 6 Camundongos C57BL/6 submetidos à depósitos de Fluoro-Gold na MCPdm e posterior exposição ao paradigma Residente-Intruso.
- 2 – Para explorar os objetivos 2 e 4, foram utilizados 3 Camundongos C57BL/6 submetidos à depósitos de Fluoro-Gold na MCPI e posterior exposição ao paradigma Residente-Intruso.
- 3 – Para explorar o objetivo 5, foram utilizados 18 Camundongos C57BL/6 submetidos à injeção de AAV5-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-PA na MCPdm.

2-Metodologia:

2.1- Grupos e Abordagem experimentais:

Na tabela abaixo é possível visualizar o tipo de animal utilizado, o marcador utilizado assim como a estrutura que recebeu o marcador:

Abordagem	Descrição
WT-DM-FG	Camundongos C57BL/6 submetidos à depósitos de Fluoro-Gold na MCPdm.
WT-L-FG	Camundongos C57BL/6 submetidos à depósitos de Fluoro-Gold na MCPI.
WT-DM-V5	Camundongos C57BL/6 submetidos à injeção de AAV5-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-PA na MCPdm.
WT-COL-V5	Camundongos C57BL/6 submetidos à injeção de AAV5-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-PA no colículo superior.

Tabela 1: Descrição dos grupos e procedimentos realizados. [ta1]

Já na segunda tabela abaixo, é possível visualizar à qual grupo experimental e objetivos específicos a abordagem acima foi utilizada assim como as tentativas e a quantidade de animais utilizados.

Grupo	Abordagem	Tentativas	Utilizados	Análise	Objetivos
1	WT-DM-FG	23	12	11	1 e 3
2	WT-L-FG	4	3	3	2 e 4
3	WT-DM-V5	15	10	10	5
4	WT-COL-V5	8	8	8	5
	Total	50	33	32	

Tabela 2: Grupos experimentais realizados (coluna Grupo), quantidade de animais que foram submetidos à cirurgia (coluna Tentativas), quantidade de animais que foram aproveitados de alguma forma (coluna Utilizados) e que foram utilizados em análise ou que podem ser utilizados (coluna Análise) e a quais objetivos o grupo atende. [ta2]

O propósito da realização de cada um dos grupos segue como abaixo:

- Grupo 1: Explorar as eferências hipotalâmicas na MCPdm.
- Grupo 2: Explorar as eferências hipotalâmicas na MCPI.
- Grupo 3: Explorar as eferências da MCPdm.
- Grupo 4: Servir como controle positivo do grupo 3.

2.2-Animais:

Para os experimentos, foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 (Biotério FMUSP, Rede de Biotérios USP), com idade entre 10 a 20 semanas como intrusos, e camundongos machos e fêmeas da linhagem Swiss (Biotério central do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP) que foram utilizados como residentes dominantes em nosso teste comportamental. Os animais foram mantidos em condições estáveis (temperatura, fotoperíodo, umidade relativa do ar) com água e ração comercial à vontade. Os procedimentos experimentais estão de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram conduzidos de acordo com as normas e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB-USP (nº 58/2016 e nº9782090821).

2.3-Cirurgia estereotáxica:

Para o depósito de Fluoro-Gold, os animais foram anestesiados com Isoforine (Isoflurano Cristália, 1.5-2.5%). Logo após, estes animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico e receberam um depósito iontoforético de 2% de FG (Fluorochrome Inc., Colo, USA) através de uma pipeta de vidro com abertura na extremidade de 20 a 30 μm . Nesta ponta estava o líquido contendo FG por onde passou uma corrente positiva de 3 μA por um período de 5 minutos, alternando-se períodos ligados e desligados por 7 segundos cada. Estas condições foram aplicadas para depósitos na MCPdm (AP=-3.95mm, ML= 0mm, DV=-2,35mm) ou MCPI (AP=-3.95mm, ML=-0.6 mm, DV=-2.7mm) (Midgard Electronics, Wood Dale, III, USA, model CS3). Para condições de refinamento dos depósitos iontoforéticos, as mesmas condições foram utilizadas apenas reduzindo a abertura para 10 μm , corrente positiva para 2 μA e período de 1 minuto.

No caso de injeção de solução contendo vetor viral, ou seja AAV5-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-PA, foram injetados com uma microseringa (Hamilton 0.5 μL), posicionadas estereotaxicamente na MCPdm (AP= -3.95mm, ML= 0mm, DV= -2,35mm) ou colículo superior (AP= -3.95mm, ML= 0mm, DV= -1,3 mm) utilizando uma bomba de infusão automática a uma taxa de infusão de 10 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ (Harvard Apparatus, pump 11 elite).

2.4-Paradigma Residente–Intruso (Miczek,1979):

Um macho e uma fêmea Swiss foram mantidos em gaiola moradia por 21 dias. O chão das gaiolas foi coberto com serragem e limpo 2 vezes por semana. Após o 20º dia, a serragem foi mantida até o teste. No 22º dia, imediatamente antes do teste, a fêmea foi retirada da gaiola moradia e foi introduzido um macho intruso C57BL/6, que havia sido previamente operado para depósito iontoforético de FG na MCPdm ou MCPI. Todos os testes foram filmados e analisados.

2.5-Análise Comportamental:

Os vídeos produzidos com uma câmera horizontal em relação ao paradigma residente-intruso foram analisados utilizando o software "Behavioral Observation Research Interactive" (versão 7.9.8) (BORIS). Cada teste comportamental foi composto por 5 min de observação após o primeiro ataque do residente, onde foram avaliados os CDS, sociais e exploratórios do intruso. Especificamente foi avaliada a duração, em porcentagem, do tempo total observado dos seguintes CDS pelo intruso (subordinado): congelamento, fuga, on-the-back, up-right, mordida de retaliação e exploração da gaiola, assim como os comportamentos agressivos realizados pelo dominante compostos por agressões diretas e indiretas. Outro comportamento também extraído do dominante foi a realização de mordidas no intruso.

Também foi utilizado o software "Detection of Object and Tracking" (versão 20.3.16) DORIS para realizar o tracking do intruso e do dominante, através de imagens obtidas por uma câmera vertical em relação ao paradigma residente-intruso. Com este software, obtivemos coordenadas (X, Y) relativas à posição do intruso e do dominante ao longo dos 5 minutos de vídeo e que possui 9000 frames (30 frames por segundo).

Aplicando o teorema de Pitágoras e algoritmo desenvolvido para a análise das coordenadas obtidas, foi possível calcular o deslocamento do intruso e do dominante frame a frame, ou a cada trigésimo de segundo ao longo do paradigma residente-intruso. O algoritmo utilizado foi processado através do Microsoft Excel 2013, e os dados foram analisados utilizando Python e bibliotecas em maiores detalhes no item 2.10.

O deslocamento analisado, é a distância do intruso ou dominante entre dois pontos temporais distintos. No esquema abaixo, por exemplo, podemos

considerar um intruso, no ponto 1 (p1) no instante 1 (t1). No instante 2 (t2), o mesmo intruso se locomoveu até o ponto 2 (p2). O deslocamento observado é a distância entre o ponto 1 e o ponto 2.

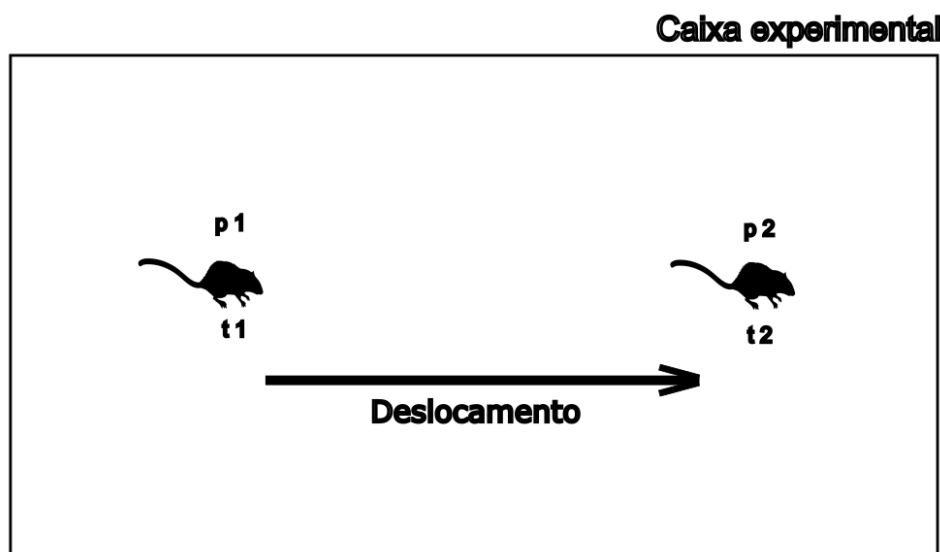


Figura 2: Representação do deslocamento do intruso ou dominante observado entre dois momentos distintos. [la2]

2.6-Perfusão:

90 minutos após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com Isoforine (Isoflurano, Cristália) e foram perfundidos por via trans-cardíaca, utilizando uma bomba peristáltica (Cole Parmer) inicialmente com 20ml de solução salina 0,9%, seguida de 150ml de uma solução fixadora de formaldeído a 4% diluído em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4). Os encéfalos foram retirados das caixas cranianas e mantidos por 1 hora a 4°C na mesma solução fixadora e transferidos para uma solução de sacarose 20% em tampão fosfato de potássio 0,02M onde permaneceram por 24 horas.

No caso do grupo 4 que não foi submetido ao paradigma residente-intruso, após um período de recuperação de 30 dias os animais foram anestesiados de forma profunda e submetidos ao mesmo procedimento descrito acima.

2.7-Microtomia:

Cortes frontais seriados, com 40µm de espessura, foram obtidos utilizando-se um micrótomo de congelação (Reicher-Young). Os cortes foram colhidos sequencialmente em 4 compartimentos, de forma que a distância entre

os cortes em um mesmo compartimento seja de 160 μ m. Esses cortes foram mantidos em solução anti-freeze contendo 15% de sacarose, tampão fosfato de sódio 0,05M e 30% de etilenoglicol em freezer -20°C.

No caso de encéfalos onde vetores virais foram empregados, não houve amplificação do sinal gerado, sendo os cortes alocados diretamente em lâminas de vidro, e então observados em microscópio fluorescente (Nikon Eclipse 80i). Todas as figuras apresentadas foram produzidas utilizando o software Inkscape (1.0.1).

2.8-Reações Imunohistoquímicas:

Na ocasião de duplas reações imunohistoquímicas para Fos e FG, após o processamento dos encéfalos, um anticorpo primário anti-Fos (Ab-5; Calbiochem, lot no. D09803) produzido em coelho foi incubado com o tecido encefálico por 72 horas à 4°C numa diluição 1:40000. Em seguida, a solução foi submetida à incubação de anticorpo secundário anti-coelho IgG (1-200, Vector Labs) produzido em cabra por uma hora e meia, e então colocado com um kit misturado em um complexo de avidina-biotina peroxidase (1-200, ABC Elite Kit; Vector Labs). O complexo peroxidase foi visualizado através da exposição de 10 a 30 minutos para uma solução cromogênica contendo 0,02% de 3,3' diaminobenzidina tetrahydroclorada (DAB; Sigma) com a presença de amônio sulfato de níquel 0,3% em tampão Tris (pH 7,6) 0,05 M somado com a presença da enzima glicose oxidase 10% que cederá H₂O₂ para o complexo peroxidase a partir da quebra da β -D-Glicose 10% juntamente com 40 mg de cloreto de amônio.

Em seguida, os cortes foram lavados e incubados novamente, mas dessa vez, com um anticorpo primário anti-FG (Ab-153; Millipore, lot no. LV1446350) em diluição 1:10000. Todos os passos foram repetidos, mas durante a exposição à solução cromogênica não houve a presença da solução de amônio sulfato de níquel 0,3%, tornando os complexos reagidos para FG na cor marrom, diferenciando-se dos complexos reagidos contra Fos que adquiriram previamente a cor preta.

2.9-Distribuição de células no eixo anteroposterior:

A distribuição das células no eixo ântero-posterior foi realizada de acordo com o atlas “The mouse brain” (Franklin; Paxinos, 2008).

2.10-Contagem de células:

Todas as contagens foram realizadas de forma manual e utilizando ImageJ software (1.52a).

2.11-Análise estatística e softwares utilizados:

Foram utilizados o software inkscape 1.1, Graph Pad Prism 6 e ambiente anaconda (conda 4.12.0) para utilização de linguagem de programação python(3.8.8) com suporte das bibliotecas: pandas(1.2.4), numpy(1.20.1), matplotlib(3.3.4), scipy(1.6.2) e pyvenn (0.1.3).

Quando correlações foram realizadas ou matriz de correlação, o teste de Pearson foi utilizado. Em todas as análises onde houve testes de hipótese, foi adotado nível de significância considerando $p \leq 0,05$ bicaudal.

3-Resultados:

3.1-Duplas marcações de FG e Fos no PMd e VMH e os CDS:

Quando analisamos a concentração de células Fos positivas dos principais núcleos hipotalâmicos, estão em destaque os núcleos PVH, PMd e VMHvl e que estão apresentadas na figura 3. Podemos observar que o núcleo PVH apresentou a maior concentração média de células Fos positivas média se comparado com os núcleos PMd e VMHvl, assim como diferença entre limites superior e inferior (2271) e diferença entre terceiro e primeiro quartil (946), demonstrando maior dispersão dos dados, quando comparado aos núcleos PMd (766, 282) e VMHvl (863, 337).

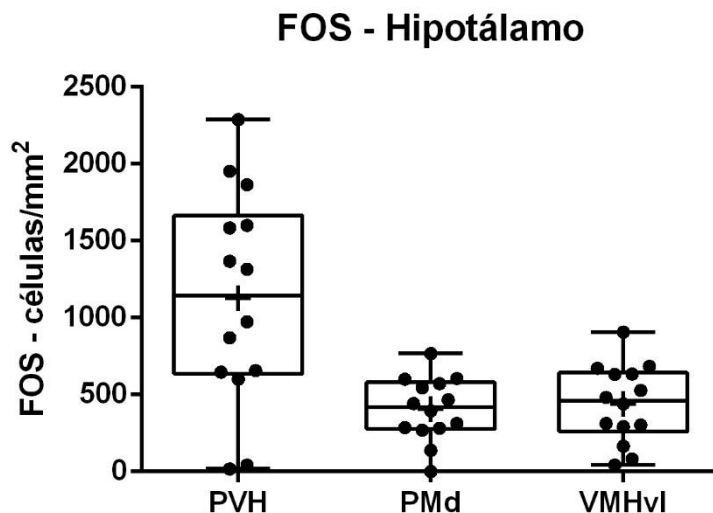


Figura 3: Gráfico boxplot demonstrando a concentração de células c-fos nos núcleos PVH, PMd e VMHvl em camundongos expostos ao paradigma residente-intruso (n=14). [a3]

Avaliando qualitativamente um caso de depósito de FG na MCPdm apresentado abaixo (Figura 4), percebe-se que o depósito de FG na MCPdm acaba também atingindo a MCPdl e o colículo superior. Observado o VMH, nota-se considerável marcação de células FG+ em todo o núcleo, mas a presença de células duplamente marcadas para FG e Fos concentra-se na porção ventrolateral e, em menor proporção, na porção central. Em relação ao núcleo PMd, observa-se menor concentração de células FG+ apesar de presentes em quase todo o núcleo. Em relação às células duplamente marcadas do núcleo, não há um padrão morfológico bem definido como no caso do VMHvl.

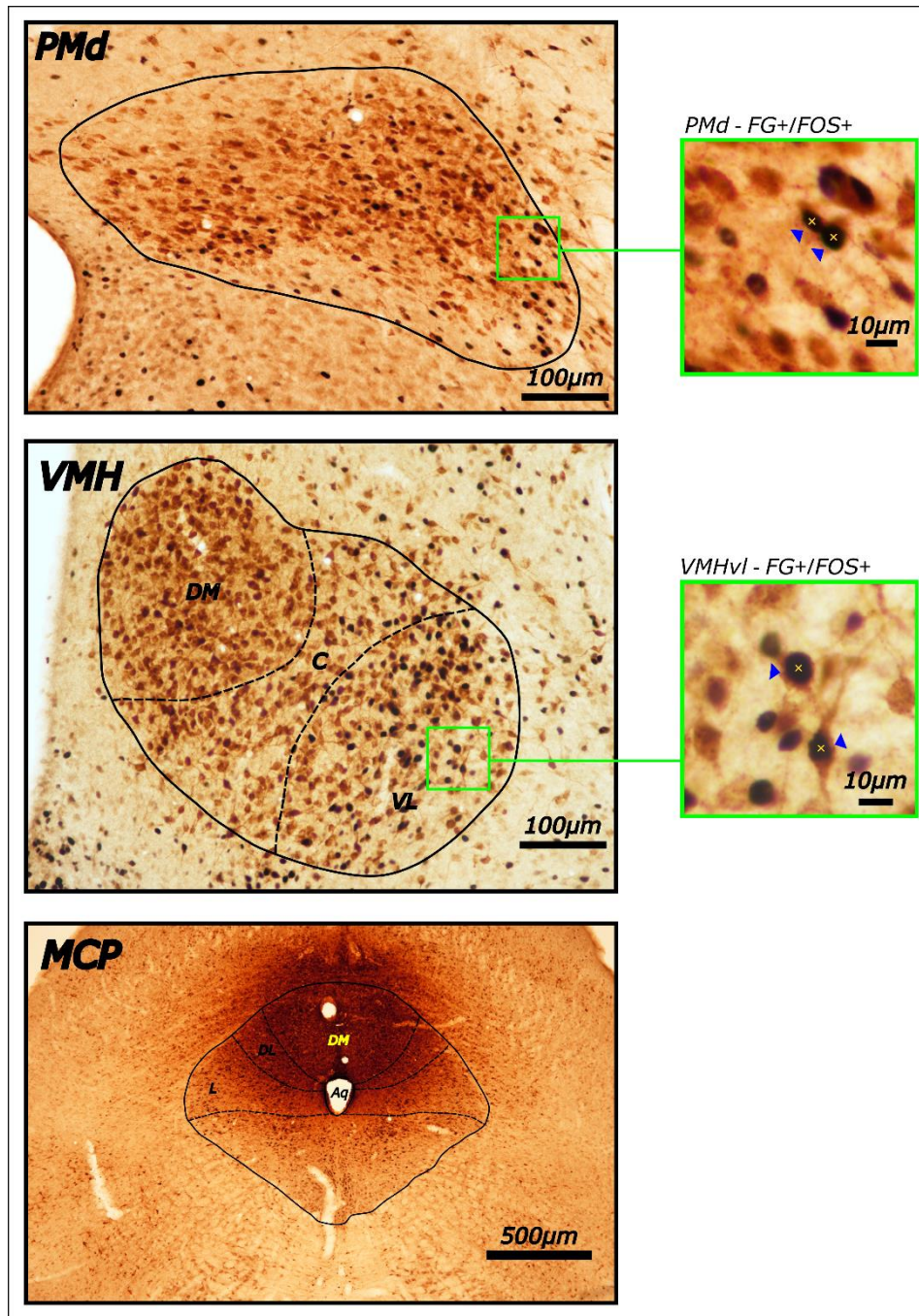


Figura 4: Fotomicrografias apresentando o sítio de depósito na MCPdm, e de marcação para FG e c-fos nos núcleos VMH e PMd de camundongos expostos ao paradigma residente-intruso. À direita, em aumento, é possível observar em destaque células duplamente marcadas, sendo a seta em azul a indicação da marcação de FG, enquanto que o "X" em amarelo, a marcação de c-fos. Na fotomicrografia da MCP, foi utilizada objetiva de aumento de 4x, enquanto que para os núcleos VMH e PMd, 20x. [la4]

Já quando o depósito foi realizado na MCPI, apresentado na figura abaixo (Figura 5), percebe-se que o depósito foi mais contido comparado ao primeiro, o que inclusive pôde ter resultado em marcações retrógradas menos intensas comparadas ao caso apresentado na Figura 4. Observando o VMH, nota-se marcação discreta de células FG+, assim como de células duplamente marcadas para FG e Fos concentradas nas porções ventrolateral e central. Já no núcleo PMd, podemos observar uma distribuição de células FG+ maior na região lateral do núcleo acompanhada pelas células duplamente marcadas.

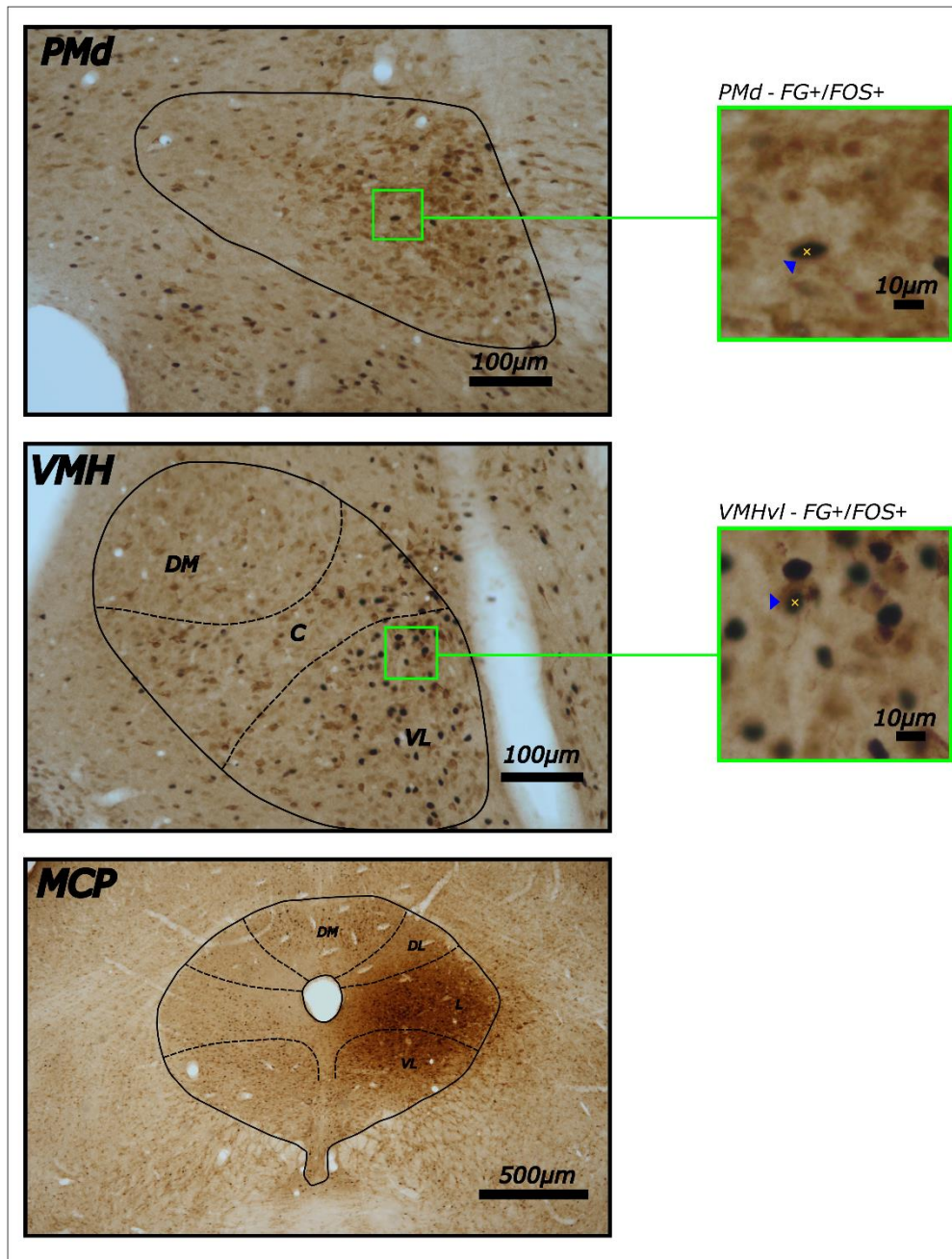


Figura 5: Fotomicrografias apresentando o sítio de depósito na MCPI, e de marcação para FG e c-fos nos núcleos VMH e PMd de camundongos expostos ao paradigma residente-intruso. À direita, em aumento, é possível observar em destaque células duplamente marcadas, sendo a seta em azul a indicação da marcação de FG, enquanto que o "X" em amarelo, a marcação de c-fos. Na fotomicrografia da MCP, foi utilizada objetiva de aumento de 4x, enquanto que para os núcleos VMH e PMd, 20x. [la5]

Analisando as células duplamente marcadas, bem como as marcações individualizadas para Fos e FG nos núcleos VMH e PMd (Figuras 6 e 7), podemos observar que 55% dos neurônios Fos positivos no PMd se projetam

para a MCPdm, enquanto que no VMHvl 43% e VMHc 52%. Dos neurônios Fos positivos do PMd, 16% se projetam para a MCPI, enquanto que VMHc 9% e VMHvl 15%. Podemos observar maior robustez retrógrada da MCPdm comparada à MCPI que pode ser atribuída à diferença de depósito, maior na MCPdm, assim como ao fato de atingir toda a MCPdm por sua posição mediana, enquanto que a MCPI, a injeção unilateral atinge apenas uma das duas colunas.

As células duplamente marcadas na via VMHdm→MCPdm apresentaram alto percentual em relação ao total de neurônios Fos positivos, mas observações importantes precisam ser realizadas. Primeiramente, a concentração desses neurônios é baixa comparada ao PMd e VMHvl além de não apresentar correlação com os CDS passivos ($R=0.04$ e $p=0.8$) e ativos ($R=0.14$ e $p=0.6$) que podem ser observados na figura 39. A alta densidade de neurônios FG positivos no VMHdm tornou a discriminação de cores difícil durante a contabilização, o que pode ter criado falsos-positivos de neurônios duplamente marcados. Esta situação não ocorreu em outros núcleos/depósitos.

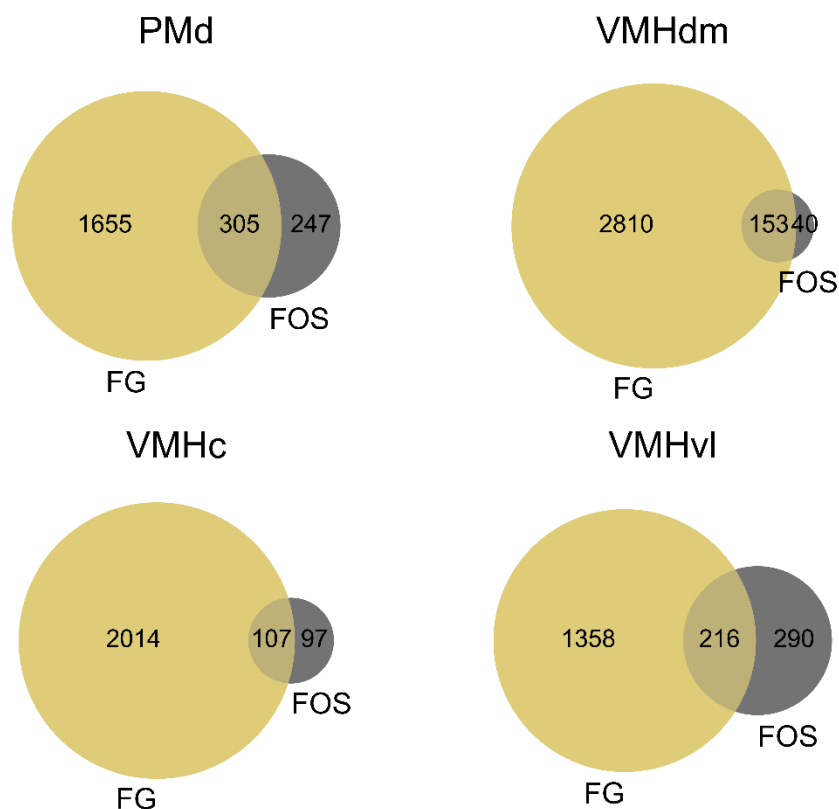


Figura 6: Para depósitos na MCPdm, a figura representa diagramas de Venn referentes à concentração de neurônios positivos por mm² para FG em amarelo e Fos em cinza escuro no PMd e subdivisões do VMH de camundongos expostos ao paradigma residente-intruso. A intersecção entre os grupos corresponde às células duplamente marcadas (n=6). [ta6]

	PMd	VMHdm	VMHc	VMHvl
Fos	553(131)	194(187)	204(103)	506(171)
FG	1961(711)	2963(1625)	2121(1276)	1574(966)
Duplas	305(198)	153(173)	107(78)	216(103)
%Fos	55%	79%	52%	43%
%FG	16%	5%	5%	14%

Tabela 3: A tabela acima apresenta a média (desvio padrão) da concentração de neurônios por mm² no PMd e subdivisões do VMH em depósitos de FG na MCPdm de camundongos expostos ao paradigma residente-intruso. Em %Fos, observamos o percentual de neurônios Fos positivos que se projetam para a MCPdm em relação ao total de neurônios Fos positivos, ou seja, revelando a proporção de neurônios ativos do PMd ou VMH que se projetam para a MCPdm. Em %FG, observamos o percentual de neurônios que se projetam para a MCPdm e que foram marcados positivamente para Fos em relação ao total de neurônios FG positivos, revelando o recrutamento da população neural que se projeta do PMd ou VMH para a MCPdm e que esteve ativa no paradigma (n=6). [ta3]

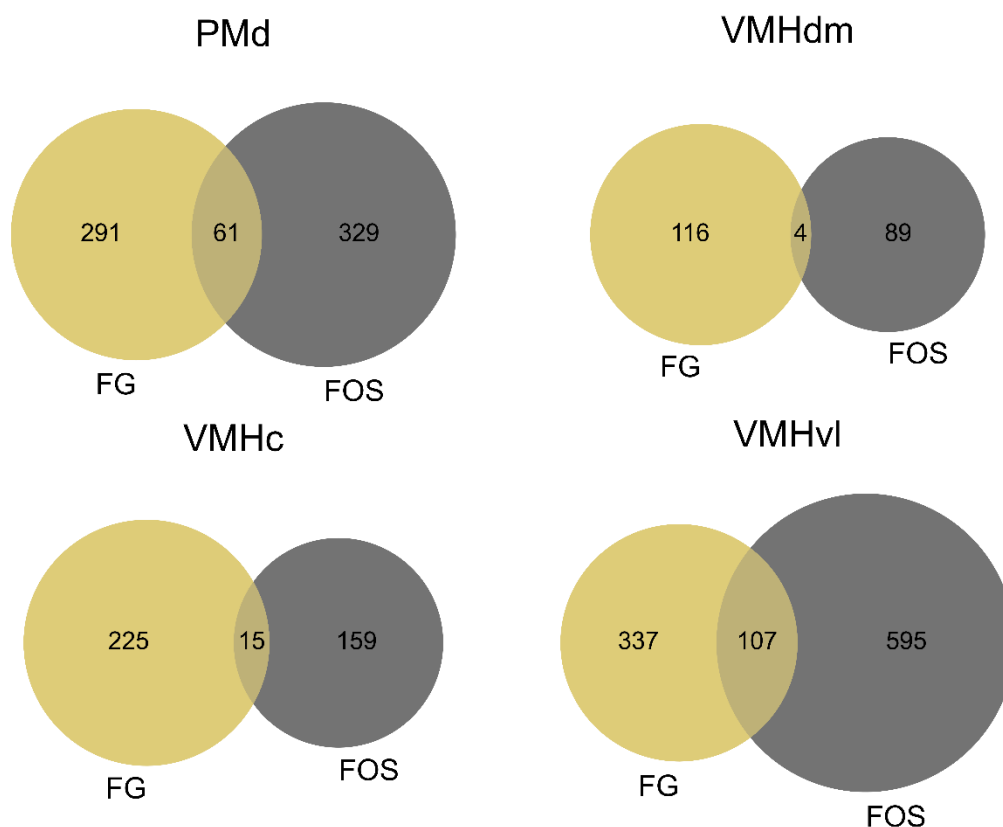


Figura 7: Para depósitos na MCPI esquerda, a figura representa diagramas de Venn referentes à concentração de neurônios positivos por mm² para FG em amarelo e Fos em cinza escuro no PMd e subdivisões do VMH de camundongos expostos ao paradigma residente-intruso. A intersecção entre os grupos corresponde às células duplamente marcadas (n=3). [ta7]

	PMd	VMHdm	VMHc	VMHvl
Fos	391(185)	94(23)	174(19)	702(191)
FG	352(139)	120(89)	240(93)	444(115)
Duplas	61(55)	4(5)	15(7)	107(30)
%Fos	16%	4%	9%	15%
%FG	17%	3%	6%	24%

Tabela 4: A tabela possui a média (desvio padrão) da concentração de neurônios por mm² para o PMd e subdivisões do VMH em depósitos de FG na MCPI esquerda de camundongos expostos ao paradigma residente-intruso. Em %Fos, observamos o percentual de neurônios Fos positivos que se projetam para a MCPI esquerda em relação ao total de neurônios Fos positivos ou seja, revelando a proporção de neurônios ativos do PMd ou VMH que se projetam para a MCPI. Em %FG, observamos o percentual de neurônios que se projetam para a MPCPI que foram marcados positivamente para Fos em relação ao total de neurônios FG positivos revelando o recrutamento da população neural que se projeta do PMd ou VMH para a MCPI e que esteve ativa no paradigma (n=3). [ta4]

A figura 8 representa a distribuição anteroposterior da concentração média de neurônios positivos para Fos, FG ou duplamente-marcados no núcleo VMHvl. Para a análise de concentração de células Fos, os casos WT-DM-FG-9 e WT-DM-FG-12 foram removidos por terem apresentado baixa expressão de neurônios Fos+ (n=12). Na análise para concentração de células FG, a linha sólida representa depósitos na MCPdm removendo os casos WT-DM-FG-A5, WT-DM-FG-A6 e WT-DM-FG-A8 por serem depósitos de menor qualidade e posicionamento (n=8). As linhas pontilhadas representam depósitos na MCPI, sendo a linha pontilhada com círculos os núcleos contralaterais ao depósito de FG (n=3) e a linha pontilhada sem círculos para núcleos ipsilaterais em relação ao depósito de FG (n=3). A concentração de neurônios duplamente marcados segue a mesma lógica, sendo apenas que no grupo MCPdm foram removidos os casos WT-DM-FG-9, WT-DM-FG-12, WT-DM-FG-5, WT-DM-FG-6 e WT-DM-FG-8 (n=6). Desta forma é possível observar maior concentração de células Fos na porção rostral do núcleo VMHvl, assim como concentração de células FG e concentração de células duplamente marcadas. Na ocasião de depósitos realizados na MCPI, o núcleo ipsilateral apresenta maior concentração de células FG e maior concentração de células duplamente marcadas. A figura 9 ilustra os resultados observados.

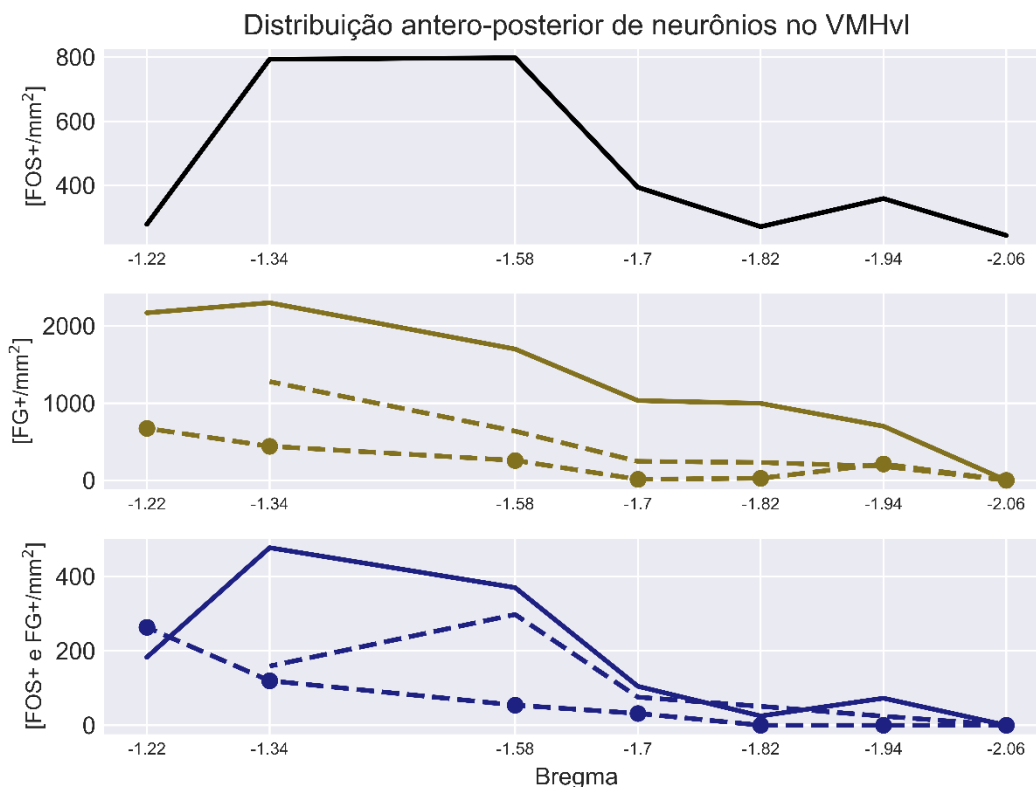


Figura 8: Distribuição anteroposterior da concentração média de neurônios marcados para Fos (n=12), FG ou duplamente marcados de camundongos expostos ao paradigma residente-intruso. Para marcações de FG, a linha sólida representa depósitos na MCPdm (n=8) enquanto que as linhas pontilhadas depósitos na MCPI (n=3). Para marcações duplas, a linha sólida representa depósitos na MCPdm (n=6) enquanto que as linhas pontilhadas depósitos na MCPI (n=3). Linhas pontilhadas com círculos representam núcleos contralaterais (n=3) enquanto que pontilhadas sem círculos núcleos ipsilaterais (n=3) para depósitos na MCPI. [a8]

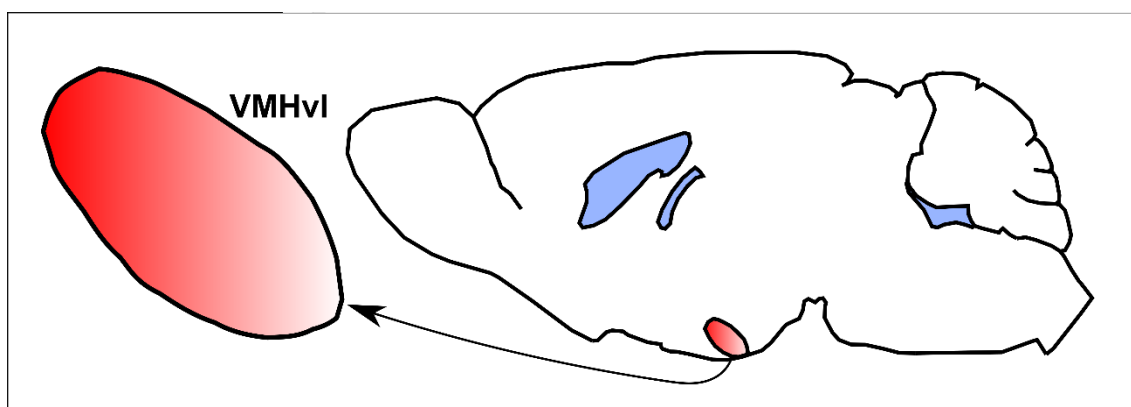


Figura 9: Ilustração esquemática sobre a distribuição de neurônios Fos+, FG+ e duplamente marcados para depósitos na MCPdm ou MCPI de camundongos expostos ao paradigma residente-intruso. [a9]

Os CDS foram divididos em CDS ativos e CDS passivos e estão apresentados na figura 10 em porcentagens totais do tempo. Como podemos observar, houve maior expressão de CDS passivos em relação à CDS ativos. Os CDS passivos (57 e 26) apresentaram diferenças entre limites superior e inferior e terceiro e primeiro quartil maior comparado aos CDS ativos (22, 7) demonstrando maior dispersão.

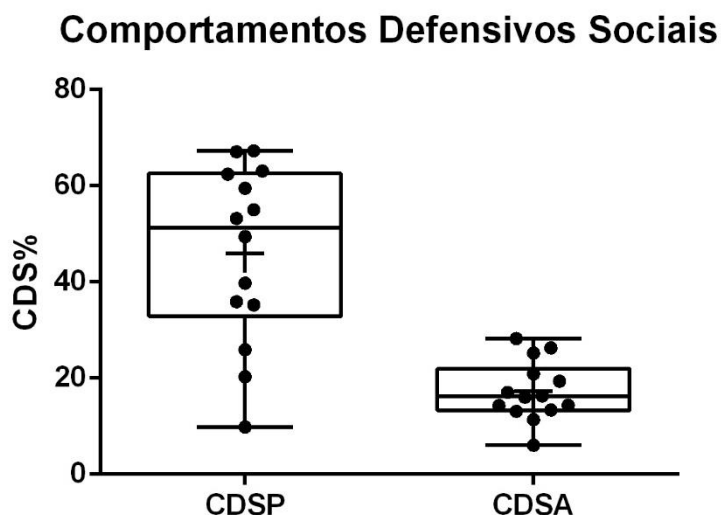


Figura 10: Gráfico boxplot demonstrando os CDS passivos (CDSP) e ativos (CDSA) de camundongos expostos ao paradigma residente-intruso(n=14).[\[a10\]](#)

A figura 11 representa os comportamentos agressivos realizados e mordidas realizadas pelo dominante. A diferença entre o limite superior e inferior e terceiro e primeiro interquartis foi maior para as mordidas (145, 30) em comparação com os comportamentos agressivos (40, 11) realizados pelo dominante demonstrando maior dispersão do grupo.

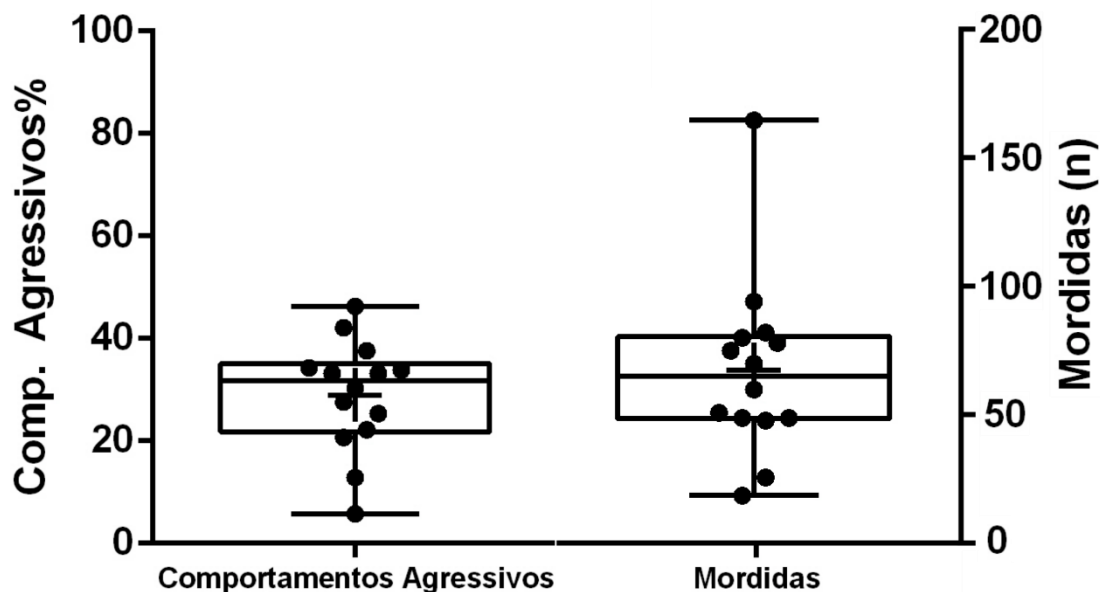


Figura 11: Gráfico boxplot demonstrando a porcentagem em que o dominante passa o tempo realizando comportamentos agressivos além da quantidade de mordidas realizadas durante o paradigma residente intruso (n=14). [a11]

Utilizando dados obtidos através do *tracking* do intruso, foi possível avaliar seu deslocamento ao longo do tempo (Figura 12). Avaliando o deslocamento dos intrusos a cada 30 segundos, é possível avaliar que os primeiros 90 segundos são marcados por intensa mobilidade do intruso devido aos comportamentos de fuga. O mesmo pode também ser observado na distribuição dos frames onde o deslocamento foi maior do que 5mm, concentrados no terço inicial do paradigma residente-intruso ($D > 5$ mm/frame). Dessa forma, podemos considerar que frames onde existe movimentação maior que 5 mm são marcadores de CDS ativo. O valor de 5,16mm foi escolhido para esta marcação uma vez que 5,16 representou o limite superior onde esteve 10% de todos os valores de movimentação dos intrusos. A correlação observada entre CDS ativos do intruso e de frames onde houve movimentação maior que 5 mm foi alta ($R = 0.84$ e $p < 0.05$) e pode ser observada na figura 79.

A partir dos 90 segundos em diante, os intrusos apresentam maior frequência de frames onde não houve movimentação ($D = 0$ mm/frame). Este marcador pode da mesma forma ser considerado como expressão de CDS passivo uma vez que registra a imobilização do intruso, que ocorre nos

comportamentos de defesa passiva. A correlação entre o percentual de CDS passivos e frames onde não houve movimentação do intruso foi muito alta ($R = 0.96$ e $p < 0.05$) e pode ser conferida na figura 75.

Os dominantes seguiram um padrão similar, mas com frames onde houve movimentação maior que 5mm, dessa forma mais distribuído ao longo do paradigma residente-intruso, além de menor expressão de frames sem mudança de posição (Figura 13). Podemos atribuir à movimentação maior que 5mm por frame do dominante aos comportamentos agressivos diretos, onde a maioria envolve rápidas investidas do dominante em direção ao intruso. Por exemplo, a correlação entre a quantidade de frames onde houve movimentação maior que 5mm do dominante e o percentual do tempo que o dominante realizou ataques diretos foi alta ($R = 0.77$ e $p < 0.005$) e pode ser avaliada na figura 55.

Os dominantes possuem maior deslocamento que os intrusos uma vez que possuem maior frequência de frames onde a movimentação foi maior que 5 mm e menor quantidade de frames onde não houve movimentação (Figura 14). Dessa forma, o *tracking* do dominante e do intruso mostram que o terço inicial do paradigma residente-intruso é marcado por CDS ativos do intruso e comportamentos agressivos diretos do dominante. Os dois terços restantes são marcados pela prevalência de CDS passivo do intruso com comportamentos agressivos diretos do dominante regulares e distribuídos.

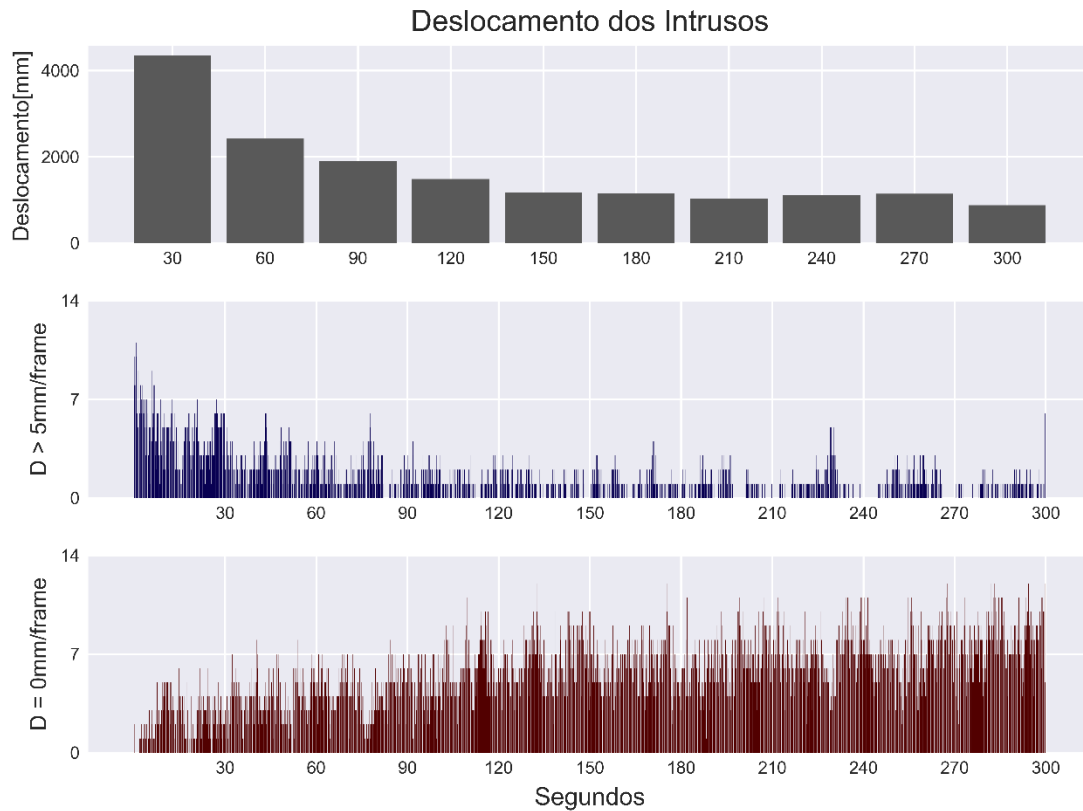


Figura 12: Gráfico representando o deslocamento dos intrusos ao longo do paradigma residente-intruso. O posicionamento do intruso foi obtido à cada 30 vezes por segundo, permitindo avaliar seu deslocamento com precisão. O deslocamento total é avaliado no gráfico superior para todos os intrusos nas respectivas faixas de tempo ($n=14$). No gráfico do meio, está representada a quantidade de intrusos onde no respectivo frame houve deslocamento maior que 5.16 mm (valor que representa o percentil de 90% de todos os deslocamentos) ($n=14$). No gráfico inferior está representada a quantidade de intrusos onde não houve deslocamento no respectivo frame ($n=14$). Tanto no gráfico do meio quanto no gráfico inferior, cada unidade do eixo x representa um trigésimo de segundo ou um frame. [la12]

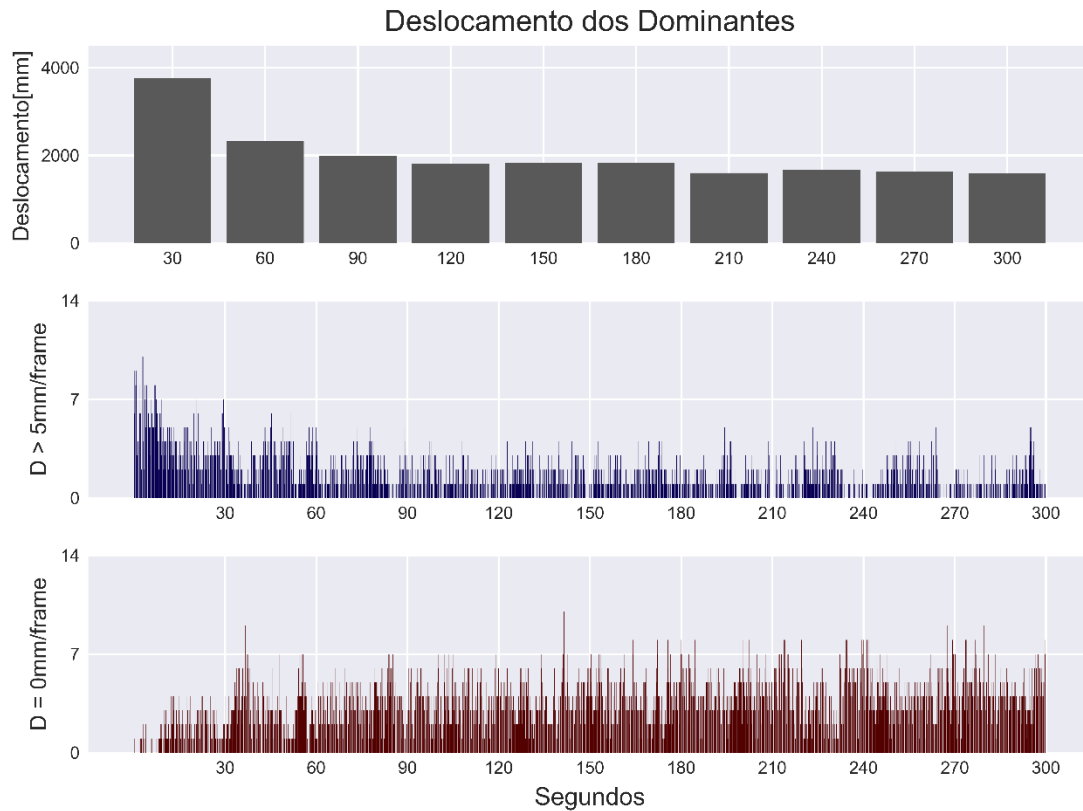


Figura 13: Gráfico representando o deslocamento dos dominantes ao longo do paradigma residente-intruso. O posicionamento do intruso foi obtido à cada 30 vezes por segundo, permitindo avaliar seu deslocamento. O deslocamento total é avaliado no gráfico superior para todos os dominantes nas respectivas faixas de tempo ($n=14$). No gráfico do meio, está representada a quantidade de dominantes onde no respectivo frame houve deslocamento maior que 5.16 mm (valor que representa o percentil 90% de todos os deslocamentos) ($n=14$). No gráfico inferior está representado a quantidade de dominantes onde não houve deslocamento em seu respectivo frame. Tanto no gráfico do meio quanto no gráfico inferior, cada unidade do eixo x representa um trigésimo de segundo ou um frame. [a13]

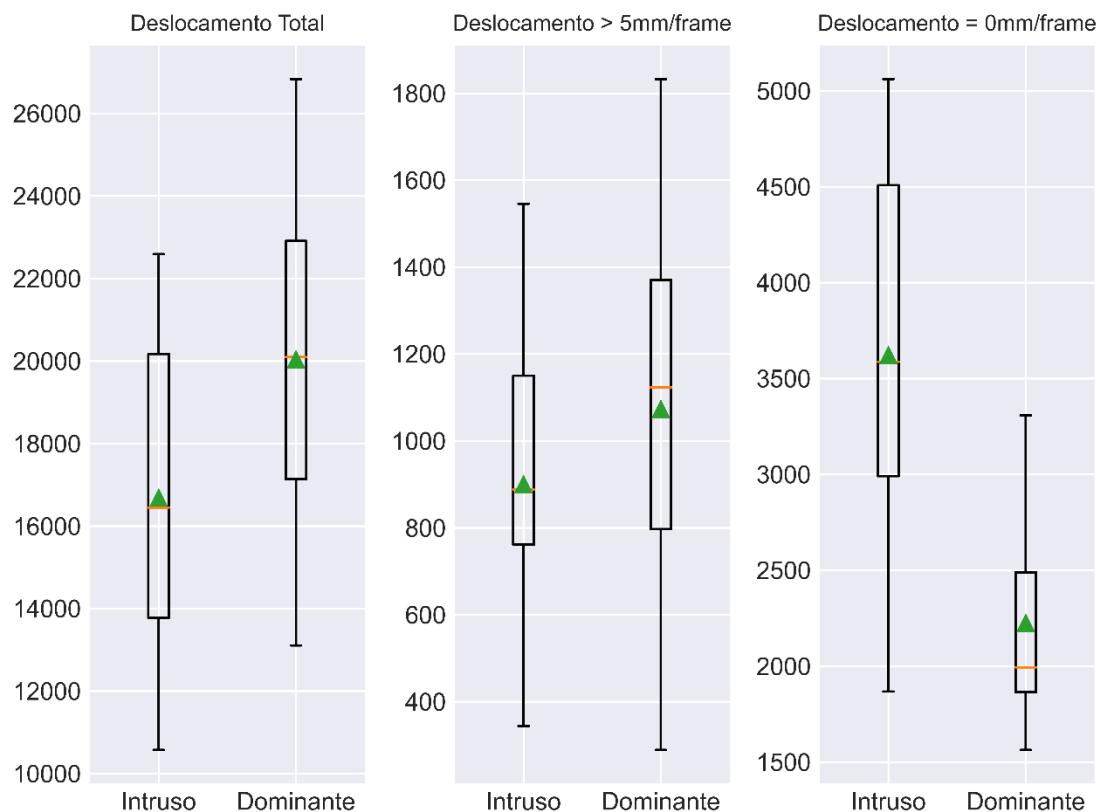


Figura 14: Gráficos representando o deslocamento de intrusos e dominantes sobre diferentes métricas. O deslocamento total, em mm, foi maior para dominantes. A frequência de frames com deslocamento maior que 5mm foi maior para dominantes. A frequência de deslocamentos iguais a zero para intrusos foi maior do que para dominantes (n=14 para cada grupo).^[14]

Uma vez que os dados comportamentais e de concentração de células Fos no hipotálamo apresentaram notável variabilidade considerando as medidas de dispersão apresentadas, foi realizada a correlação entre esta concentração no PMd e o percentual de CDS passivo realizado pelo intruso. Na figura 15, está apresentada a correlação realizada, onde foi observado coeficiente de correlação alto, positivo ($R = 0,74$) e significativo ($p = 0,002$).

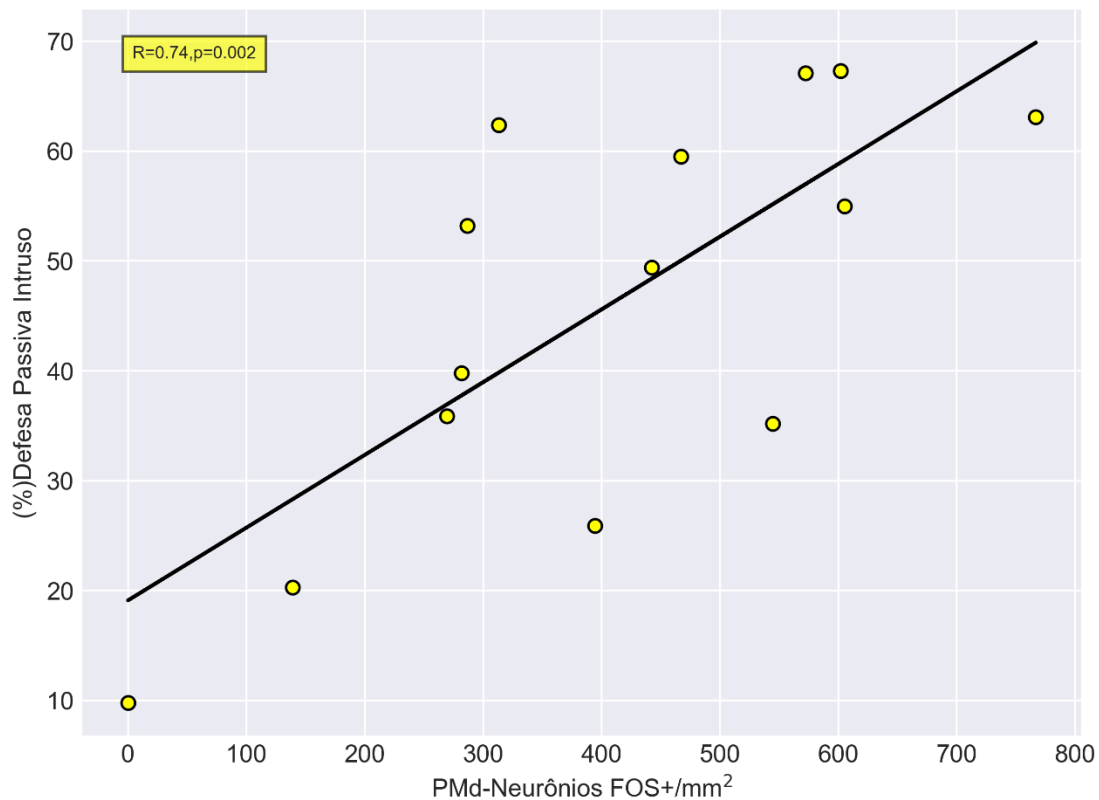


Figura 15: Correlação entre CDS passivos e concentração de células Fos no núcleo PMd (n=14) de camundongos expostos ao paradigma residente-intruso. [15]

Para explorar a relação entre as demais variáveis analisadas ao longo do trabalho, foi realizada uma correlação de matrizes para obter uma visão ampla e que pode ser analisada nos resultados complementares (Figura 24 e 25).

Na figura 16, é possível observar o resultado da correlação de neurônios c-fos+ no VMHc, VMHvl, PMd e PVH com a expressão de congelamento. Neste caso, todas as correlações, que podem ser observadas abaixo, apresentaram resultado significativo ($p < 0,05$).

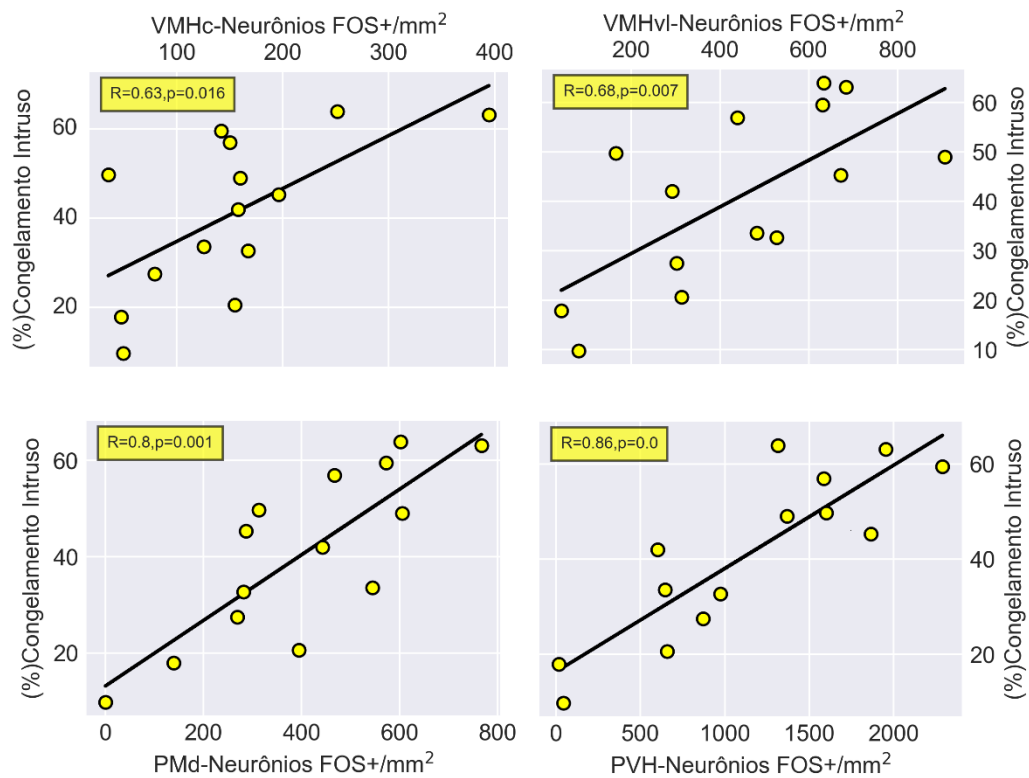


Figura 16: Correlação da expressão do comportamento de congelamento com a correlação da concentração de neurônios Fos+ positivos no canto superior esquerdo com VMHc ($R=0.63, p=0.016$), no canto superior direito com o VMHvl ($R=0.68, p=0.007$), no canto inferior esquerdo com o PMd ($R=0.8, p=0.001$) e no canto inferior direito com o PVH ($R=0.86, p=< 0.001$) de camundongos expostos ao paradigma residente-intruso. [16]

Já na figura 17, onde é possível observar a correlação para os comportamentos de fuga, apenas os núcleos VMHc e PVH apresentaram resultado significativo ($p < 0,05$).

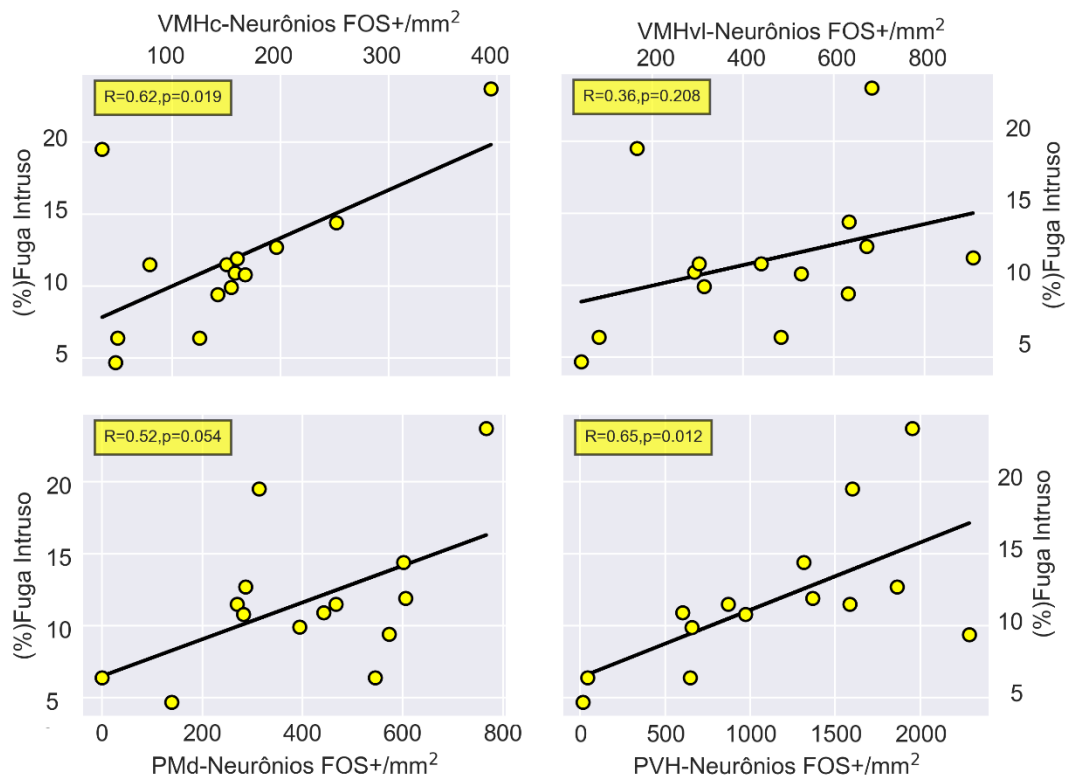


Figura 17: Correlação da expressão do comportamento de fuga com a concentração de neurônios Fos+ no canto superior esquerdo com VMHc ($R=0.62$, $p=0.019$), no canto superior direito com o VMHvl ($R=0.36$, $p=0.208$), no canto inferior esquerdo com o PMd ($R=0.52$, $p=0.054$) e no canto inferior direito com o PVH ($R=0.65$, $p=0.012$) de camundongos expostos ao paradigma residente-intruso. [a17]

Na figura 18, é possível observar a influência do percentual do tempo gasto pelo dominante realizando ataques diretos que está positivamente correlacionado com o percentual de congelamento ($R=0.6$, $p=0.024$) e de fuga ($R=0.9$, $p<0.001$).

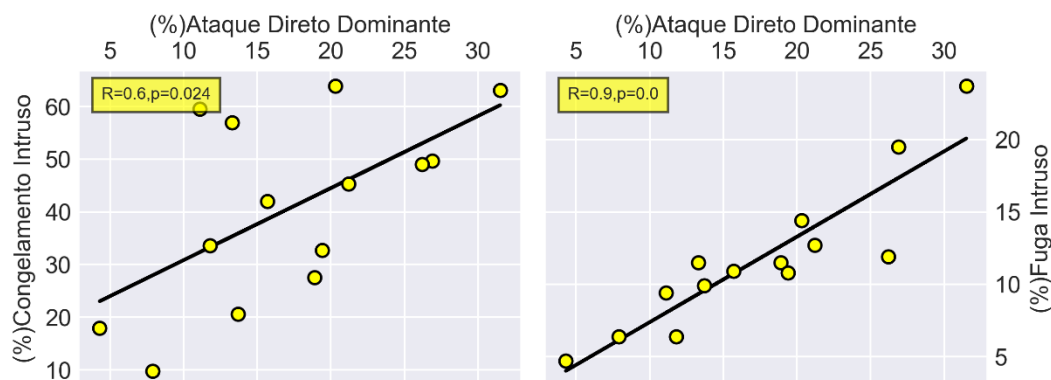


Figura 18: Correlação da expressão do comportamento de congelamento e fuga com o percentual do tempo que o dominante gastou realizando ataques diretos da esquerda para a direita ($R=0.6$, $p=0.024$) e ($R=0.9$, $p=< 0.001$) de camundongos expostos ao paradigma residente-intruso. [18]

3.2-Projeções anterógradas da MCPdm:

Foi aplicado o vetor viral AAV5-hSyn-hChr2(H134R)-EYFP-WPRE-PA na MCPdm para mapear os principais alvos da MCPdm. Foram utilizados 14 animais que foram submetidos à injeção de vetores virais na MCPdm em diferentes doses, para que fosse possível, ao longo das repetições, diminuir ao máximo a área de injeção e assim apenas atingir neurônios da MCPdm evitando neurônios da MCPdl e colículo superior. Devido à movimentação de retorno da ponta da agulha injetora, resíduos sempre sobravam no colículo superior contaminando a estrutura. Como controle positivo, também foram injetados diretamente no colículo superior, sem infectar a MCPdm, 8 animais. As estruturas em que foram observadas projeções da MCPdm apenas, estão destacadas na tabela 5:

Nome completo	Sigla	Intensidade de projeção
Área dorsal hipotalâmica	DA	++++
Porção posterior do núcleo paraventricular do tálamo	PVP	++++
Núcleo magno da raphe	RMg	++++
Área hipotalâmica anterior	AHA	++++
Núcleo dorsomedial do hipotálamo	DM	++++
Núcleo subparafascicular do tálamo	SPF	+++
Células dopaminérgicas A11	A11	+++
Células dopaminérgicas A13	A13	+++
Área pre-Cuneiforme	PrCnf	+++
Núcleo cuneiforme	CnF	+++
Coluna Lateral da Matéria Cinzenta Periaquedutal	MCPI	+++
Coluna Ventrolateral da Matéria Cinzenta Periaquedutal	MCPvl	+++
Núcleo Gigantocelular, porção alpha	GiA	+++
Núcleo medio-dorsal do tálamo	MD	++
Núcleo central medial do tálamo	CM	++
Porção peduncular do hipotálamo lateral	PLH	++
Zona Incerta	ZI	++
Porção anterior do núcleo paraventricular do tálamo	PVA	++
Células dopaminérgicas A13	A13	++
Núcleo Lithoid	Lth	++
Porção caudal do núcleo pontino reticular	PnC	++
Núcleo Medial do Septo	MS	+
Área medial pré-óptica	MPA	+
Núcleo central medial do tálamo	CM	+
Núcleo latero-anterior do hipotálamo	LA	+
Núcleo pré-óptico magnocelular	MCPO	+
Porção peduncular do hipotálamo lateral	PLH	+
Núcleo paraventricular do hipotálamo (porção magno)	PVH	+
Núcleo central medial do tálamo	CM	+
Porção peduncular do hipotálamo lateral	PLH	+
Locus coeruleus	LC	+
Núcleo de Barrington	Bar	+

Tabela 5: Estruturas que apresentaram projeções anterógradadas da MCPdm organizadas por intensidade/concentração da projeção avaliada de forma qualitativa. [ta5]

Abaixo, é possível visualizar as principais projeções mencionadas na tabela acima.

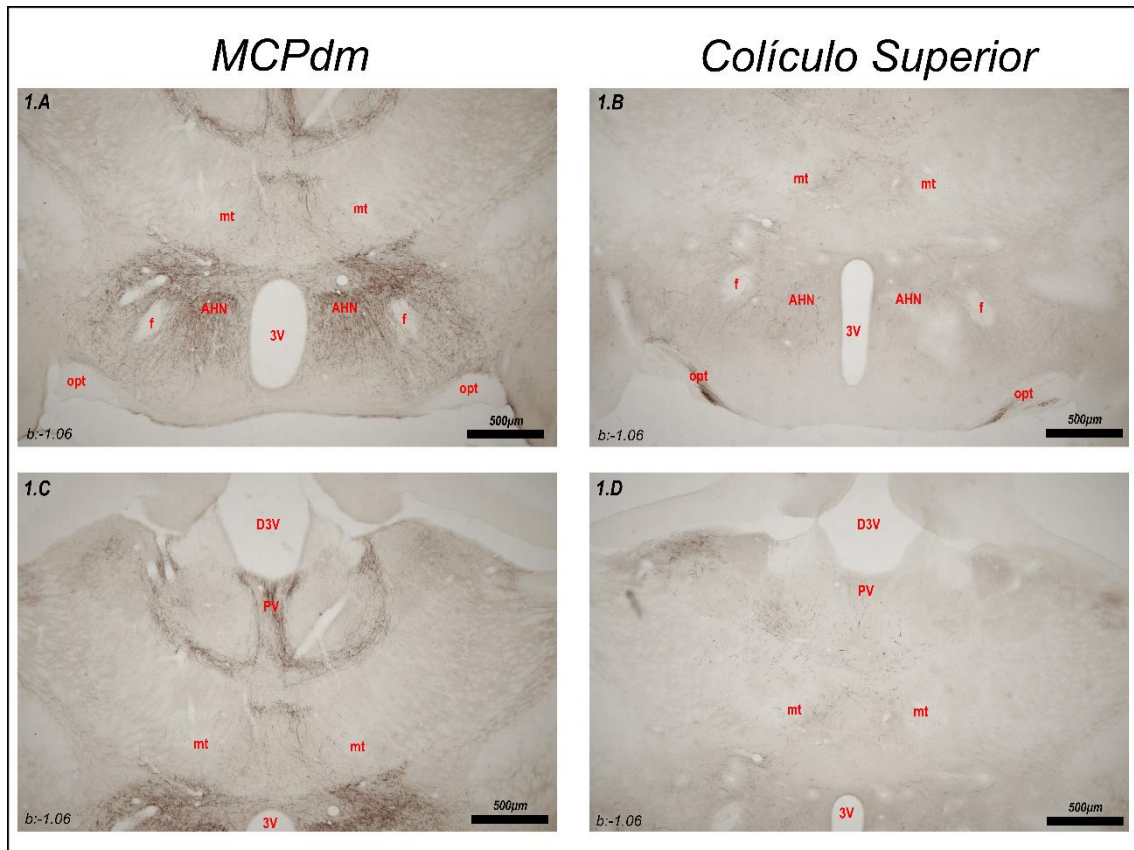


Figura 19: Fotomicrografias apresentando projeções anterógradas a partir de injeção na MCPdm à esquerda (itens 1.A e 1.C) e colículo superior à direita (itens 1.B e 1.D). Todas as imagens representam cortes aproximadamente no nível do bregma -1.06mm em objetiva de 4x. Abreviações: 3V(3° ventrículo), f (fórnix), opt (trato óptico), mt (trato mamilo-talâmico), D3V (3° ventrículo dorsal) AHN (núcleo anterior do hipotálamo), PV (núcleo paraventricular do tálamo). [la19]

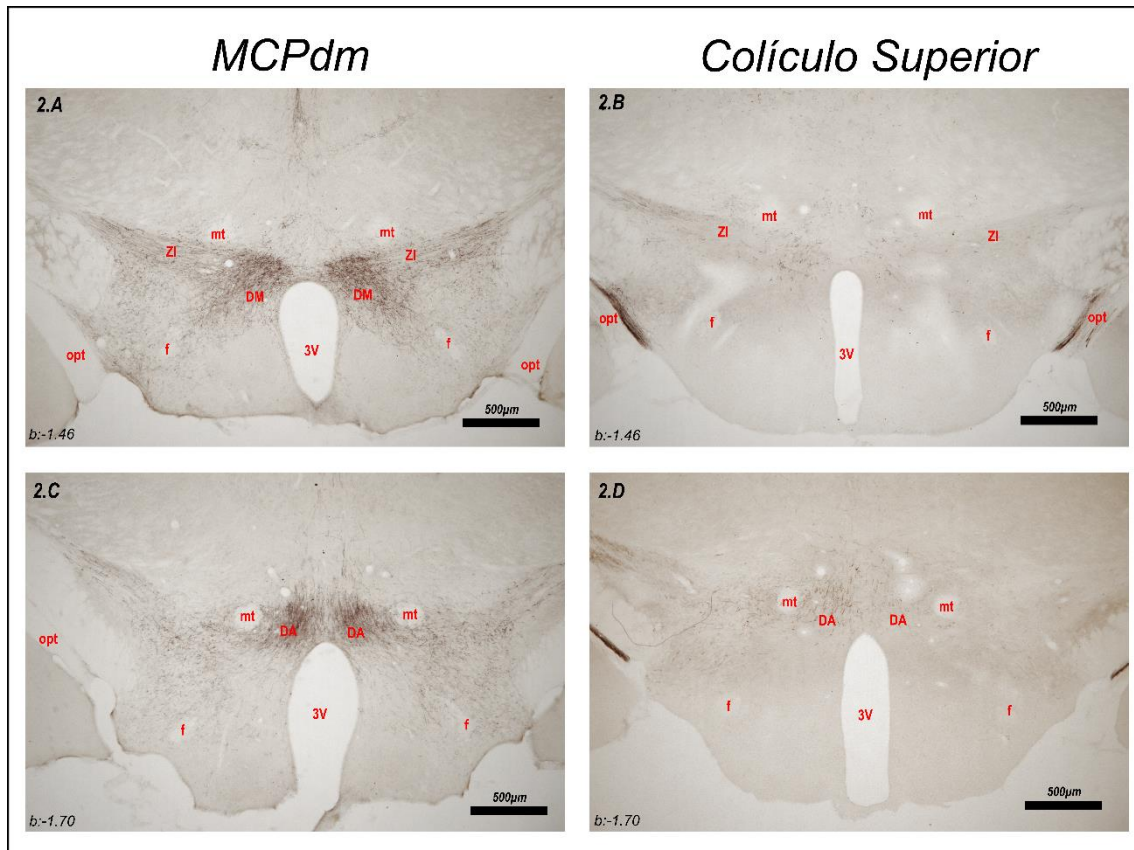


Figura 20: Fotomicrografias apresentando projeções anterógradas a partir de injeção na MCPdm à esquerda (itens 2.A e 2.C) e colículo superior à direita (itens 2.B e 2.D). Todas as imagens estão em objetiva de 4x. As imagens 2.A e 2.B representam aproximadamente o nível do bregma -1.46mm , enquanto que 2.C e 2.D $-1,7\text{mm}$. Abreviações: 3V(3° ventrículo), f (fórnix), opt (trato óptico), mt (trato mamilo-talâmico), DM (núcleo dorsomedial do hipotálamo), ZI (zona incerta), DA (área dorsal hipotalâmica). [a20]

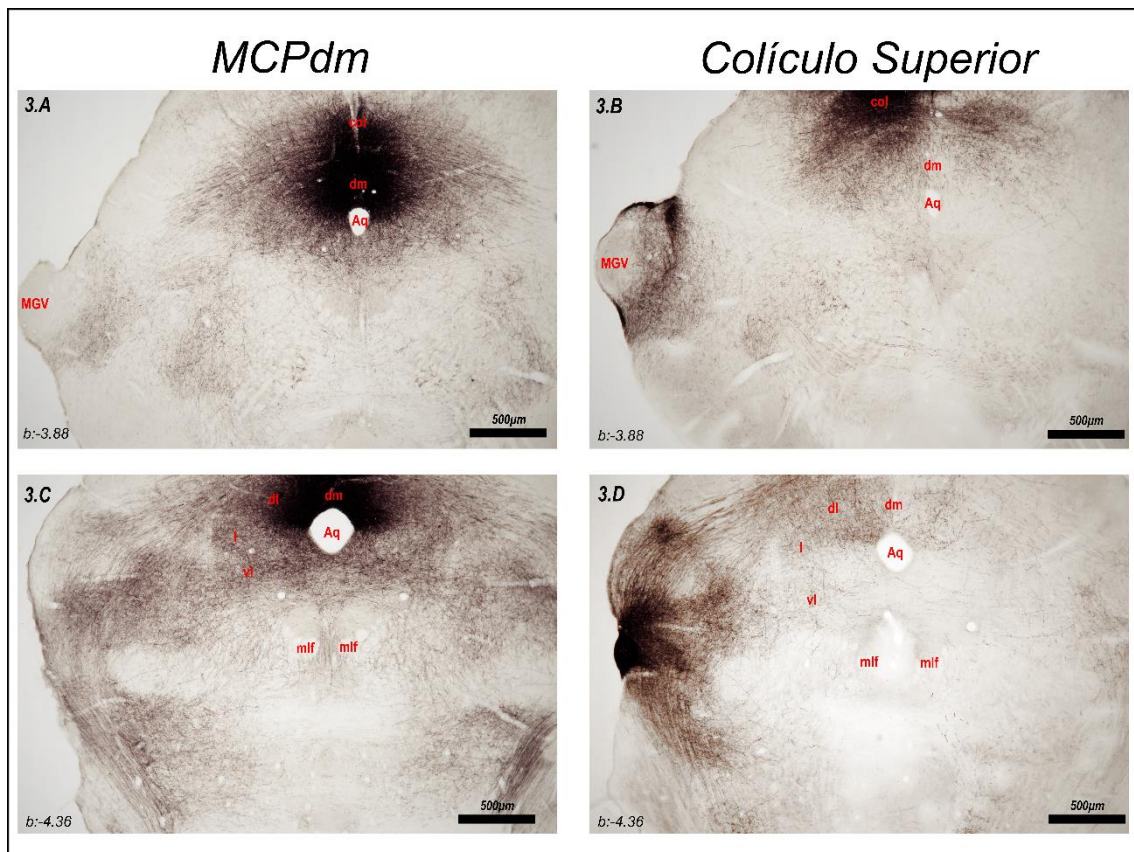


Figura 21: Fotomicrografias apresentando sítio de injeção na MCPdm (item 3.A) e sítio de injeção no colículo superior (item 3.B). Os itens 3.A e 3.C apresentam projeções anterógradas da MCPdm, enquanto os itens 3.B e 3.D projeções anterógradas do colículo superior. Todas as imagens estão em objetiva de 4x. As imagens 3.A e 3.B representam aproximadamente o nível do bregma -3.88mm , enquanto 3.C e 3.D -4.36mm . Abreviações: Aq (Aqueduto), mlf (fascículo medial longitudinal), dm (matéria cinzenta periaquedutal, coluna dorsomedial), dl (matéria cinzenta periaquedutal, coluna dorsolateral), l (matéria cinzenta periaquedutal, coluna lateral), vl (matéria cinzenta periaquedutal, coluna ventrolateral), col (colículo superior), MGV (núcleo medial geniculado, porção ventral) [la21]

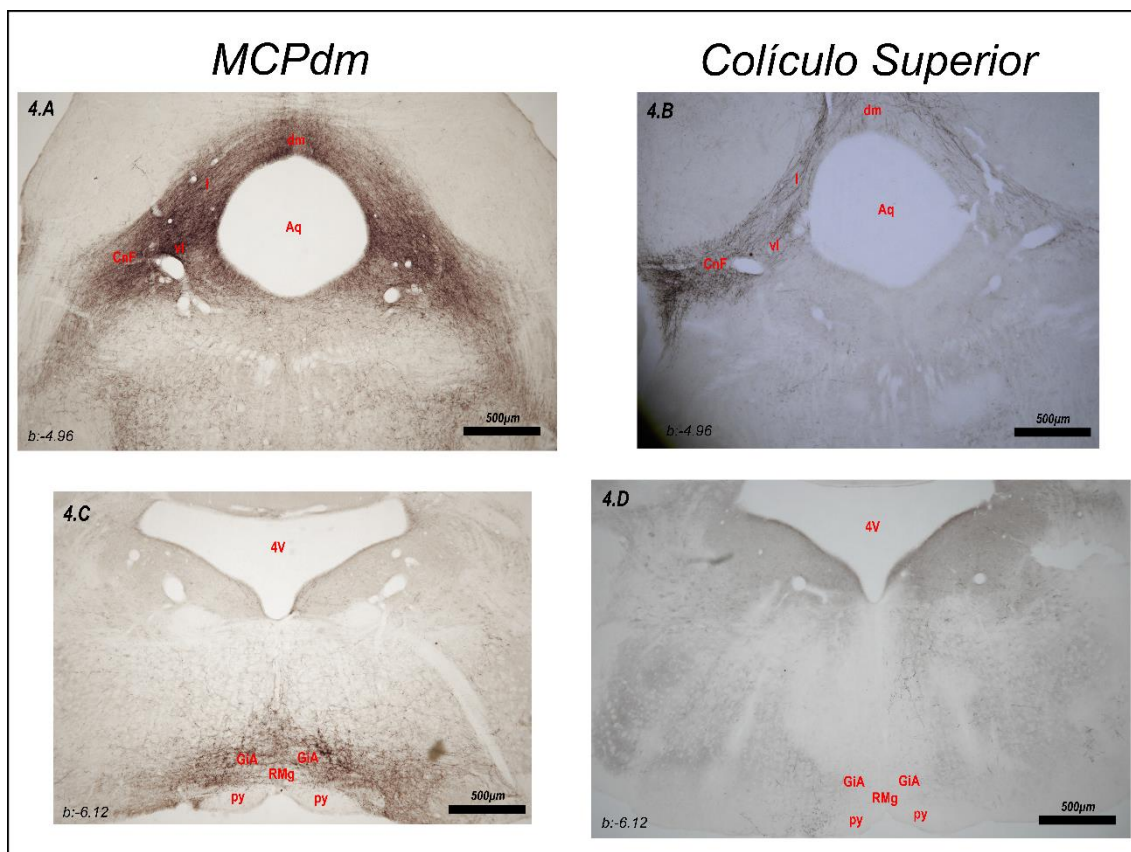


Figura 22: Fotomicrografias apresentando projeções anterógradas a partir de injeção na MCPdm à esquerda (itens 4.A e 4.C) e colículo superior à direita (itens 4.B e 4.D). Todas as imagens estão em objetiva de 4x. As imagens 4.A e 4.B representam aproximadamente o nível do bregma -4.96mm , enquanto 3.C e 3.D -6.12mm . Abreviações: Aq (Aqueduto), 4V (4° ventrículo), py (trato piramidal), dm (matéria cinzenta periaquedutal, coluna dorsomedial), I (matéria cinzenta periaquedutal, coluna lateral), vl (matéria cinzenta periaquedutal, coluna ventrolateral), CnF (núcleo cuneiforme), GiA (núcleo gigante celular reticular, porção alfa), RMg (núcleo magno da raphe). [a22]

4-Discussão:

A base neural dos CDS vem sendo estudada há mais de 40 anos, sendo que neste campo, vários pesquisadores e grupos depositaram sua contribuição em diferentes aspectos (Blanchard; Blanchard et al., 1977, Miczek, 1979, Martinez, 2002, Motta et al. 2009, Wang et al., 2019, Diaz; Lin 2020, de Almeida; Baldo; Motta 2022), sendo que, utilizando vetores virais, um detalhamento mais profundo foi obtido sobre o papel do núcleo VMHvl nos CDS (Wang et al., 2019).

Em camundongos submetidos ao paradigma residente-intruso, foi observada a presença de células duplamente marcadas para Fos e FG no PMd e VMHvl quando depositados na MCPdm. Observamos neurônios Fos positivos no VMHvl e PMd recrutados durante o CDS e que se projetam para a MCPdm

ou para a MCPI em camundongos. Foram notadas células Fos positivas específicas aos CDS no VMHvl e PMd que se projetam para outras estruturas que não a MCPdm ou MCPI uma vez que não possuíam marcação para FG. Também foram observadas projeções do VMHvl e PMd para a MCPdm ou MCPI que não estão ativas durante o paradigma residente-intruso, demonstrando assim três populações neurais presentes em cada núcleo.

Os resultados demonstram que aproximadamente de um terço a metade dos neurônios Fos+ no PMd e VMHvl se projetam para a MCPdm, consolidando o fato que a MCPdm representa um alvo importante para estes dois núcleos no contexto da defesa social. O mesmo é válido para a MCPI.

Também foram observados neurônios que se projetam do PMd ou VMHvl para MCPdm ou MCPI e que não estão ativos durante a exposição ao CDS. Estes neurônios representam vias que podem estar ativas em outros contextos comportamentais ou que sua inativação compõe parte do processamento relativo ao CDS.

Em relação à distribuição de neurônios no eixo anteroposterior do núcleo VMHvl, foi observado maior concentração de neurônios Fos positivos, FG positivos e duplamente marcados na porção anterior do núcleo. Este resultado está de acordo com resultados observados anteriormente (Wang et al. 2019, Lo et al. 2019) e indica que a porção anterior do VMHvl está mais envolvida na organização do CDS quando comparada à porção caudal.

A literatura do PMd é consideravelmente reduzida, e a maioria dos trabalhos está voltada para o contexto da defesa anti-predatória (Wang et al. 2021). Ainda assim, podem contribuir para a compreensão do papel do núcleo no contexto da defesa social. Em camundongos expostos à predadores, foi observado que a população CCK+ esteve mais ativa quando camundongos exibiam comportamentos de fuga, e menos ativa quando congelavam (Wang et al. 2021). Quando esta população foi inibida quimiogeneticamente, o comportamento de congelamento não foi alterado, mas reduziu a velocidade das respostas de fuga, assim como a ativação optogenética que aumentou a velocidade de fuga e não alterou a resposta de congelamento (Wang et al. 2021). O estudo leva a crer que o PMd possa estar envolvido apenas com

comportamentos de fuga, o que é contraditório com estudos prévios utilizando lesão citotóxica do PMd em ratos expostos à predadores (Cezario et al. 2008) ou coespecíficos agressores (Mota et al. 2009) onde a resposta de congelamento foi abruptamente reduzida comparada ao grupo controle. O estudo também é contraditório em relação aos resultados observados neste trabalho, onde a concentração de neurônios Fos+ esteve correlacionada com o comportamento de congelamento ($R=0,8$), mas não esteve com o comportamento de fuga ($R=0,52$).

Observado em ratos, o núcleo PMd apresenta diferenças de marcação por Fos a depender do estímulo aversivo apresentado. No caso, a região dorsomedial apresenta especificidade quando ratos são expostos à coespecíficos agressores, enquanto que a região ventrolateral, especificidade quando expostos à predadores, sendo que esta porção se projeta preferencialmente para a MCPdl, enquanto que a porção dorsomedial para as colunas MCPdm e MCPI (Motta et al. 2009). Estas particularidades observadas em ratos não ocorrem em camundongos.

Também em ratos expostos à coespecíficos agressores, sabe-se que a lesão citotóxica do PMd, além de reduzir abruptamente o congelamento, não altera a expressão de CDS ativo (Motta et al. 2009) além de reduzir a expressão de Fos na MCPdm e MCPI (Almeida et al. 2023). Já a lesão citotóxica da MCPdm em ratos expostos à coespecíficos agressores praticamente abole o CDS passivo, enquanto que gera aumento na expressão de CDS ativo além de reduzir a expressão de Fos no PMd (Almeida et al. 2023). Desta forma, a MCPdm aparenta estar relacionada a CDS passivos e não ativos no contexto do comportamento defensivo social em ratos.

Sabe-se que o comportamento de congelamento é mediado através da MCPvl. Foi demonstrado que projeções gabaérgicas do núcleo central da amígdala para a neurônios gabaérgicos da MCPvl desinibem neurônios glutamatérgicos que se projetam para o núcleo magnocelular da medula que é uma estrutura chave na expressão do congelamento. Por outro lado, a ativação de neurônios glutamatérgicos na MCPdl/MCPI induz o comportamento de fuga, ativando neurônios gabaérgicos da MCPvl que tonicamente inibem neurônios glutamatérgicos e que projetam para a medula magnocelular (Tovote et al. 2016).

Recentemente, foi demonstrado que o núcleo cuneiforme (CUN) presente no mesencéfalo e considerado uma extensão da própria MCP e participa da expressão de comportamentos defensivos (Bindi et al., 2023, Tsang et al. 2023). Esta estrutura, recebe e envia projeções de diversas estruturas relacionadas à expressão de comportamentos defensivos anti-predatórios e defensivos sociais, com destaque para a MCP, em especial para a MCPdl que recebe e envia as projeções mais densas, e que quando a população glutamatérgica desta estrutura que se projeta para o CUN é ativa em camundongos gera preferencialmente a resposta de fuga (Tsang et al. 2023), apesar de a ativação optogenética completa do núcleo em ratos induzir congelamento e fuga (Bindi et al. 2023). Como mencionado anteriormente que as colunas MCPdl e MCPI podem inibir as colunas MCPvl responsáveis pela expressão de congelamento (Tovote et al. 2016).

O núcleo VMHvl está relacionado com uma ampla variedade de comportamentos sociais, além do comportamento defensivo, como comportamentos agressivo em fêmeas (Liu et al., 2022), em machos (Zha et al., 2020), reprodutivo (Liu et al., 2022) e onde o dimorfismo sexual da estrutura implica em expressões comportamentais e metabólicas diferentes entre machos e fêmeas (Krause; Ingraham et al. 2017).

Foi observado que neurônios do VMHvl que se projetam para a MCPdm projetam também ramos colaterais para estruturas como a porção dorsal do núcleo subparafascicular (SPFd), AHA e ZI e neurônios do VMHvl que se projetam para o MPO, emitem colaterais para estruturas como o PVH, LS, AHA. Interessantemente, neurônios do VMHvl que se projetam para o MPO estão localizados posteriormente, e neurônios que se projetam para a MCPdm estão localizados anteriormente, e estes dois grupos neuronais apresentam pouca ou nenhuma sobreposição (Lo et al., 2019).

No presente corpo de resultados, foi observada alta expressão de Fos+ no núcleo PVH sem projeção direta para a MCPdm ou MCPI e correlacionada com a expressão de comportamento defensivo social.

O núcleo PVH é conhecido por apresentar três subdivisões: magnocelular, mediocelular e parvocelular (Kiss; Martos; Palkovits 1991). A

porção parvocelular do PVH apresenta neurônios que produzem o peptídeo CRH que estimula o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, sendo ativo em várias formas de estresse (Herman; Tasker, 2016, Daviu; Bens, 2021). Ainda, as porções magnocelular e parvocelular apresentam neurônios positivos para os nonapeptídeos ocitocina ou vasopressina (Biang et al. 2012, Kelly; Goodson 2014, Althammer; Grinevich, 2017). Sabe-se que o paradigma residente-intruso, também conhecido como derrota social, causa a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, levando ao aumento da concentração plasmática de corticosterona dos derrotados (Dulka et al., 2018), além de elevar a expressão de Fos nesta estrutura (Martinez; Calvo-Torrent.; Herbert, 2002).

Na literatura, existem evidências demonstrando que o núcleo PVH pode desempenhar um papel comportamental aversivo rápido independente de efeitos neuroendócrinos (Füzesi et al., 2016, Mangieri et al., 2019, Daviu; Bens, 2021). Sabe-se que faz parte da composição da estrutura, neurônios magnocelulares ocitocinérgicos que estão relacionados a efeitos de longo prazo gerados por estímulos dolorosos, como o condicionamento aversivo (Guzmán et al., 2013, Martinon et al., 2019, Olivera-Pasilio; Dabrowska, 2020), demonstrando funções mais amplas que o papel neuroendócrino.

Em estudo simulando a predação aérea em camundongos, neurônios CRH+ apresentaram aumento de atividade com conseqüente redução de mobilidade. Alguns instantes após a simulação de predação aérea, estes neurônios apresentaram redução de atividade com subseqüente comportamento de fuga para um abrigo. Quando estes mesmos neurônios foram inativados optogeneticamente, houve redução nas respostas de fuga. Coletivamente com outros estudos, a atividade de neurônios CRH+ do PVH mostrou importante papel em rápidas mudanças comportamentais relacionadas à ataques de predadores que podem ser mediados através de projeções para o LHA ou cápsula externa do globo pálido (Daviu; Bens 2021).

Uma das estruturas que recebe projeções dos neurônios glutamatérgicos e CRH+ do PVH é a região lateral do hipotálamo (Füzesi et al. 2016). Entretanto, a lesão citotóxica da porção justadorsal não foi capaz de alterar a expressão de comportamentos defensivos sociais em ratos, mas reduziu a expressão da

avaliação de risco quando re-expostos ao contexto onde o paradigma residente-intruso ocorreu (Rangel et al., 2016).

As mordidas realizadas pelo dominante sobre o intruso são um componente importante dos estímulos que o dominante gera sobre o intruso. Por exemplo em estudo prévio, foi apontado que camundongos dominantes realizam a maior parte das mordidas na região dorsal posterior dos intrusos (Blanchard; Blanchard 1977) e foi constatado que o núcleo SPFM pode desempenhar papel neste aspecto, além de possuir neurônios duplamente marcados que se projetam para a MCPdm em ratos (Almeida et al. 2023).

O estímulo doloroso induz a ativação de diversas estruturas encefálicas, com destaque para o hipotálamo (Bonapersona et al., 2022). Sabe-se que a MCPvl juntamente com o bulbo rostroventromedial e corno dorsal da medula compõe a via modulatória da dor onde a neurotransmissão opióide possui papel chave na analgesia (Lueptow; Fakira; Bobeck, 2018).

Ainda considerando o aspecto nociceptivo do CDS, recentemente, foi descrita uma projeção de neurônios parvicelulares OXT+ que se projetam para MCPvl. Esta projeção ocitocinérgica preferencialmente é direcionada a neurônios gabaérgicos da MCPvl. Além disto, em torno de 1 quinto das células da MCPvl possuem neurônios positivos para receptor de ocitocina. Sabe-se que esta via produz analgesia e é recrutada durante o processamento da dor, sendo que os autores consideram uma hipótese testável sobre o papel que a via pode desempenhar no comportamento de congelamento (Iwasaki et al., 2023).

A MCP está envolvida com a organização de diversos comportamentos, mesmo quando tratamos apenas de comportamentos defensivos. Entender como esta estrutura e suas colunas organizam e expressam estes comportamentos é desafiador. Para analisar os alvos da MCPdm, foi realizada a injeção de vetores virais anterógrados. Foram observadas diferentes estruturas densamente marcadas para as projeções da MCPdm.

A área anterior do hipotálamo (AHA) recebe estas projeções da MCPdm, e recentemente foi demonstrado que esta estrutura possui papel chave em interações sociais afiliativas, e que são abolidas quando interações sociais aversivas ocorrem (Jabarin et al., 2022) além de crítica na execução de

comportamentos agressivos-defensivos contra não coespecíficos (Xie et al. 2022). A AHA é uma estrutura composta em 90% por neurônios GABAérgicos (Xie et al. 2022). As principais funções comportamentais sociais da AHA são antagônicas a defesa, e pode ser que esta projeção MCPdm→ AHA iniba o funcionamento do AHA. As estruturas alvo da população vGAT+ do AHA são LS, VMH, PMd, PMv e PVH. A principal via responsável pela expressão do comportamento defensivo de ataque foi da AHA para a MCPvl (Xie et al. 2022).

Os núcleos dorsomedial do hipotálamo (DM) e área dorsal do hipotálamo (DA) também apresentaram densas projeções provenientes da MCPdm. O núcleo dorsomedial envia projeções para o PVH e possui função chave no processamento do estresse, principalmente através de efeitos neuroendócrinos e autonômicos (Brasil et al. 2019). A DA possui papel na regulação térmica e frequentemente é recrutada em respostas de estresse (Machado et al., 2018).

O núcleo paraventricular do tálamo (PVT) recebe projeções da MCPdm. É uma estrutura que pode estar relacionado à vários comportamentos (Choi; McNally, 2017), incluindo defesa, possuindo papel no congelamento e *avoidance* (Ma et al. 2021).

Ainda, projeções do grupo de neurônios dopaminérgicos A11 e A13 foram observadas e podem estar relacionadas à direta regulação motora e controle da dor (Koblinger et al., 2018). Este núcleo comparado aos demais grupos dopaminérgicos diencefálicos (12,13 e 14) o grupo A11 foi o único que apresenta projeções diretas para regiões da medula do nível T10 ao L5(Qu et al., 2006).

O núcleo magno da raphe está envolvido com o controle da dor (Condés-Lara et al., 2012) e com o controle respiratório (Morinaga; Nakamuta; Yamamoto, 2019), já o núcleo gigantocelular envolvido com o controle motor (Lemieux; Bretzner, 2019), sendo que ambas as estruturas recebem projeções da MCPdm.

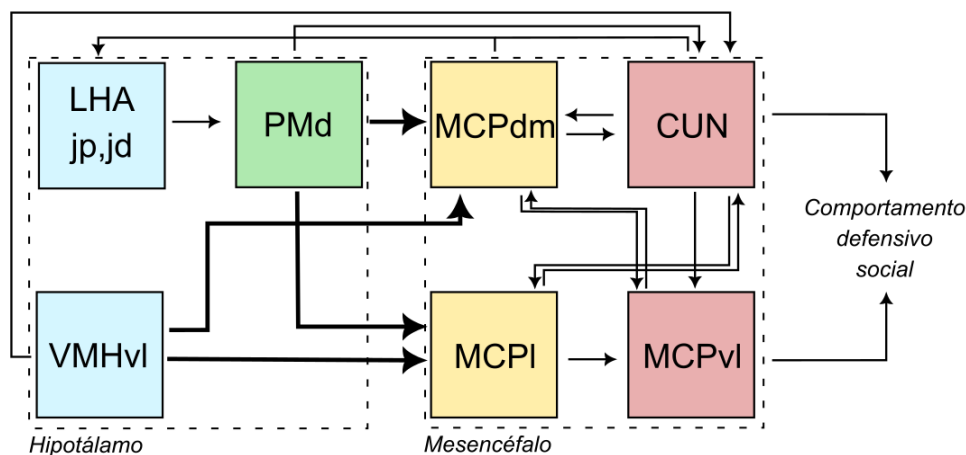


Figura 23: O esquema acima sintetiza a base neural dos CDS com base na literatura e resultados observados. Em resumo, os resultados indicam que as projeções do VMHvl e PMd para as colunas MCPdm e MCPi organizam os CDS e que por sua vez recrutam estruturas como o CUN e MCPvl. A figura acima foi modificada a partir de Almeida e colaboradores (2023) e Motta e colaboradores (2009). [a23]

Historicamente, o paradigma residente-intruso foi aplicado em machos, apesar de sabermos a importância de se estudar também o modelo em fêmeas considerando as maiores frequências de depressão e ansiedade na população feminina (Kuske; Trainor, 2022).

Recentemente na literatura, foi disponibilizado um novo método para a replicação do paradigma residente-intruso, adicionando odor de macho sobre fêmeas para que a agressão possa ocorrer por parte do dominante (Harris et al., 2018). Outras opções incluem a utilização de outras espécies de roedores onde a agressão entre fêmeas é mais comum do que em ratos e camundongos como *Mesocricetus auratus*, *Peromyscus californicus*, *Microtus ochrogaster* (Kuske; Trainor, 2022) e *Meriones unguiculatus* (Pan et al., 2023). Em específico, a *Meriones unguiculatus* é altamente territorialista e naturalmente exibe comportamentos agressivos contra intrusas do mesmo sexo (Pan et al., 2023).

Esta mesma espécie, quando exposta à uma agressora de forma aguda, leva ao aumento de células Fos+ no VMHvl, MCPd, PVH, MEA entre outras estruturas comparada ao grupo controle (Pan et al., 2020), demonstrando a viabilidade de se estudar o CDS também em fêmeas e com mobilização de estruturas já bem descritas em machos.

Quando comparamos análises comportamentais realizadas por humanos com análises realizadas por algoritmos que tem por objetivo automatizar tarefas, podemos citar vários aspectos onde um método supera o outro. Como neste trabalho, a análise humana não foi removida, mas apenas complementada, vale ressaltar alguns aspectos positivos das análises realizadas via algoritmos comparada a análises realizadas por humanos. Análises realizadas por humanos possuem o viés do cansaço devido a tarefas repetitivas assim como a variabilidade na forma de análise entre observadores que podem comprometer a qualidade das análises (Sturman et al., 2020).

No contexto do paradigma residente-intruso, a utilização de dados provenientes da movimentação do intruso e do dominante se mostraram formas efetivas de se analisar os principais CDS do intruso assim como os comportamentos agressivos do dominante, alinhando temporalmente o comportamento de dois animais. Além do mais, técnicas como *calcium-imaging* e optogenética tendem a ser cada vez mais utilizadas. Este tipo de abordagem experimental tende a gerar um volume cada vez maior e complexo de dados (Paninski; Cunningham, 2018), o que pode necessitar de análises e ferramentas cada vez mais robustas e aprofundadas em ciência de dados.

5-Conclusão:

O CDS é processado por diversas estruturas encefálicas para que ocorra, de forma apropriada, a expressão de cada comportamento. A literatura já havia definido que os núcleos VMHvl e PMd exibem funções críticas no processamento comportamental no contexto do CDS e que seus alvos mais prováveis seriam a MCPdm e MCPI. Através da dupla marcação de projeções retrógradas, foi descrito que estas projeções para a MCPdm e MCPI estão ativas durante o CDS. O resultado consolida uma porção importante da circuitaria neural do CDS e possibilita o estudo de novas hipóteses, vias e estruturas pertinentes ao CDS. Considerando resultados recentes, a partir da MCPdm e MCPI, os alvos mais prováveis para a continuação da sinalização do CDS são a MCPvl, o CUN e projeções ascendentes para o LHA.

Referências:

Althammer F., Grinevich V. Diversity of oxytocin neurons: beyond magno- and parvocellular cell types?. *J Neuroendocrinol.* 2017 Oct 12. doi: 10.1111/jne.12549. Epub ahead of print. PMID: 29024187.

Assareh N., Sarrami M., Carrive P., McNally G.P. The organization of defensive behavior elicited by optogenetic excitation of rat lateral or ventrolateral periaqueductal gray. *Behav Neurosci.* 2016 Aug;130(4):406-14. doi: 10.1037/bne0000151. Epub 2016 May 30. PMID: 27243807.

Beisner B.A., Jin J., Fushing H., Mccowan B. Detection of social group instability among captive rhesus macaques using joint network modeling. *Curr Zool.* 2015 Feb;61(1):70-84. doi: 10.1093/czoolo/61.1.70. PMID: 26052339; PMCID: PMC4454484.

Biag J., Huang Y., Gou L., Hintiryan H., Askarinam A., Hahn J.D., Toga A.W., Dong H.W. Cyto- and chemoarchitecture of the hypothalamic paraventricular nucleus in the C57BL/6J male mouse: a study of immunostaining and multiple fluorescent tract tracing. *J Comp Neurol.* 2012 Jan 1;520(1):6-33. doi: 10.1002/cne.22698. PMID: 21674499; PMCID: PMC4104804.

Bindi RP, Guimarães CC, de Oliveira AR, Melleu FF, de Lima MAX, Baldo MVC, Motta SC, Canteras NS. Anatomical and functional study of the cuneiform nucleus: A critical site to organize innate defensive behaviors. *Ann N Y Acad Sci.* 2023 Mar;1521(1):79-95. doi: 10.1111/nyas.14954. Epub 2023 Jan 6. PMID: 36606723.

Blanchard R. J., Blanchard D. C. Aggressive Behavior in the Rat. *Behavioral Biology.* Vol. 21: 197-224, 1977. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(77\)90308-X](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(77)90308-X).

Blanchard D.C., Blanchard R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol.* 1988;39:43-68. doi: 10.1146/annurev.ps.39.020188.000355. PMID: 2894198.

Bonapersona V., Schuler H., Damsteegt R., Adolfs Y., Pasterkamp R.J., van den Heuvel M.P., Joëls M., Sarabdjitsingh R.A. The mouse brain after foot shock in four dimensions: Temporal dynamics at a single-cell resolution. *Proc Natl Acad*

Sci U S A. 2022 Feb 22;119(8):e2114002119.doi: 10.1073/pnas.2114002119. PMID: 35181604; PMCID: PMC8872757.

Brasil T.F.S., Lopes-Azevedo S., Belém-Filho I.J.A., Fortaleza E.A.T., Antunes-Rodrigues J., Corrêa F.M.A. The Dorsomedial Hypothalamus Is Involved in the Mediation of Autonomic and Neuroendocrine Responses to Restraint Stress. *Front Pharmacol.* 2020 Jan 23;10:1547.doi: 10.3389/fphar.2019.01547. PMID: 32038236; PMCID: PMC6989482.

Canteras N. S., Swanson L. W. The dorsal premammillary nucleus: An unusual component of the mammillary body. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Vol. 89(21): 10089-10093, 1992. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10089>.

Canteras N. S., Simerly R. B., Swanson L. W. Organization of Projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology.* Vol. 348: 41-79, 1994. <https://doi.org/10.1002/cne.903480103>.

Canteras N. S., Simerly R. B., Swanson, L. W. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology.* Vol. 360: 213-245, 1995. <https://doi.org/10.1002/cne.903600203>.

Cezario A.F., Ribeiro-Barbosa E.R., Baldo M.V., Canteras N.S. Hypothalamic sites responding to predator threats--the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. *Eur J Neurosci.* 2008 Sep;28(5):1003-15.doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06392.x. Epub 2008 Aug 8. PMID: 18691328.

Cheney D.L. Extent and limits of cooperation in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jun 28;108 Suppl 2(Suppl 2):10902-9.doi: 10.1073/pnas.1100291108. Epub 2011 Jun 20. PMID: 21690405; PMCID: PMC3131815.

Choi E.A., McNally GP. Paraventricular Thalamus Balances Danger and Reward. *J Neurosci.* 2017 Mar 15;37(11):3018-3029.doi: 10.1523/JNEUROSCI.3320-16.2017. Epub 2017 Feb 13. PMID: 28193686; PMCID: PMC6596734.

Condés-Lara M., Rojas-Piloni G., Martínez-Lorenzana G., Díez-Martínez D.C., Rodríguez-Jiménez J. Functional interactions between the paraventricular hypothalamic nucleus and raphe magnus. A comparative study of an integrated homeostatic analgesic mechanism. *Neuroscience*. 2012 May 3;209:196-207. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.02.032. Epub 2012 Feb 22. PMID: 22390942.

Daviu N., Bains JS. Should I Stay or Should I Go? CRHPVN Neurons Gate State Transitions in Stress-Related Behaviors. *Endocrinology*. 162(6):bqab061. 2021. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqab061>.

de Almeida AP, Baldo MVC, Motta SC. Dynamics in brain activation and behaviour in acute and repeated social defensive behaviour. *Proc Biol Sci*. 289(1976):20220799. 2022. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.0799>.

Deng H., Xiao X., Wang Z. Periaqueductal Gray Neuronal Activities Underlie Different Aspects of Defensive Behaviors. *J Neurosci*. 2016 Jul 20;36(29):7580-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4425-15.2016. PMID: 27445137; PMCID: PMC6705556.

Diaz V., Lin D. Neural Circuits for Coping with Social defeat. *Current Opinion in Neurobiology*. Vol. 60: 99-117, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.11.016>.

Duguid S., Melis, A. P. How animals collaborate: Underlying proximate mechanisms. *Cognitive Science*. Vol. 11 (5): 1-18, 2020. <https://doi.org/10.1002/wcs.1529>.

Dulka B.N., Koul-Tiwari R., Grizzell J.A., Harvey M.L., Datta S., Cooper M.A. Dominance relationships in Syrian hamsters modulate neuroendocrine and behavioral responses to social stress. *Stress*. 2018 Jun 22:1-6. doi: 10.1080/10253890.2018.1485646. Epub ahead of print. PMID: 29932809; PMCID: PMC6309596.

Franklin, K. B. J.; Paxinos, G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. Third Edition. 2008.-

Füzesi T., Daviu N., Wamsteeker Cusulin J.I., Bonin R.P., Bains J.S. Hypothalamic CRH neurons orchestrate complex behaviours after stress. *Nat Commun*. 2016 Jun 16;7:11937. doi: 10.1038/ncomms11937. PMID: 27306314; PMCID: PMC4912635.

Gross C. T., Canteras, N. S. The many paths to fear. *Nature Reviews Neuroscience*. Vol. 13: 651-658, 2012.<https://doi.org/doi:10.1038/nrn3301>.

Guzmán Y.F., Tronson N.C., Jovasevic V., Sato K., Guedea A.L., Mizukami H., Nishimori K., Radulovic J. Fear-enhancing effects of septal oxytocin receptors. *Nat Neurosci*. 2013 Sep;16(9):1185-7. doi: 10.1038/nn.3465. Epub 2013 Jul 21. PMID: 23872596; PMCID: PMC3758455.

Harris A.Z., Atsak P., Bretton Z.H., Holt E.S., Alam R., Morton M.P., Abbas A.I., Leonardo E.D., Bolkan S.S., Hen R., Gordon J.A. A Novel Method for Chronic Social Defeat Stress in Female Mice. *Neuropsychopharmacology*. 2018 May;43(6):1276-1283. doi: 10.1038/npp.2017.259. Epub 2017 Nov 1. PMID: 29090682; PMCID: PMC5916350.

Helanterä H., Kulmuni J., Pamilo P. Sex allocation conflict between queens and workers in *Formica pratensis* wood ants predicts seasonal sex ratio variation. *Evolution*. 2016 Oct;70(10):2387-2394. doi: 10.1111/evo.13018. Epub 2016 Aug 23. PMID: 27485635.

Herman J. P., Tasker, J. G. Paraventricular hypothalamic mechanisms of chronic stress adaptation. *Frontiers in Endocrinology*. Vol. 7 (137), 2016.<https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00137>.

Iwasaki M., Lefevre A., Althammer F., Clauss Creusot E., Łąpieś O., Petitjean H., Hilfiger L., Kerspern D., Melchior M., Küppers S., Krabichler Q., Patwell R., Kania A., Gruber T., Kirchner M.K., Wimmer M., Fröhlich H., Dötsch L., Schimmer J., Herpertz S.C., Ditzen B., Schaaf C.P., Schönig K., Bartsch D., Gugula A., Trenk A., Blasiak A., Stern J.E., Darbon P., Grinevich V., Charlet A. An analgesic pathway from parvocellular oxytocin neurons to the periaqueductal gray in rats. *Nat Commun*. 2023 Feb 24;14(1):1066. doi: 10.1038/s41467-023-36641-7. PMID: 36828816; PMCID: PMC9958129.

Jabarin R., Dagash W., Netser S., Singh S., Paul B.K., Barkai E., Wagner S. Modulation of social investigation by anterior hypothalamic nucleus rhythmic neural activity. *iScience*. 2022 Dec 30;26(2):105921. doi: 10.1016/j.isci.2022.105921. PMID: 36685037; PMCID: PMC9852926.

Kelly A.M., Goodson J.L. Social functions of individual vasopressin-oxytocin cell groups in vertebrates: what do we really know?.*Front Neuroendocrinol.* 2014 Oct;35(4):512-29.doi: 10.1016/j.yfrne.2014.04.005. Epub 2014 May 9. PMID: 24813923.

Kiss J. C., Martos, J., Palkovits, M. Hypothalamic paraventricular nucleus: A quantitative analysis of cytoarchitectonic subdivisions in the rat. *The Journal of Comparative Neurology.* Vol. 311(4):563-573, 1991.<https://doi.org/10.1002/cne.903130403>.

Koblinger K., Jean-Xavier C., Sharma S., Füzesi T., Young L., Eaton S.E.A., Kwok C.H.T., Bains J.S., Whelan P.J. Optogenetic Activation of A11 Region Increases Motor Activity.*Front Neural Circuits.* 2018 Oct 11;12:86.doi: 10.3389/fncir.2018.00086. PMID: 30364230; PMCID: PMC6193508.

Krause W.C., Ingraham H.A. Origins and Functions of the Ventrolateral VMH: A Complex Neuronal Cluster Orchestrating Sex Differences in Metabolism and Behavior.*Adv Exp Med Biol.* 2017;1043:199-213.doi: 10.1007/978-3-319-70178-3_10. PMID: 29224096; PMCID: PMC5839321.

Kuske J.X., Trainor B.C. Mean Girls: Social Stress Models for Female Rodents. *Curr Top Behav Neurosci.* 2022;54:95-124.doi: 10.1007/7854_2021_247. PMID: 34532840; PMCID: PMC9812211.

Lee N.S., Goodwin N.L., Freitas K.E., Beery A.K. Affiliation, Aggression, and Selectivity of Peer Relationships in Meadow and Prairie Voles.*Front Behav Neurosci.* 2019 Mar 19;13:52.doi: 10.3389/fnbeh.2019.00052. PMID: 30941022; PMCID: PMC6433777.

Lemieux M., Bretzner F. Glutamatergic neurons of the gigantocellular reticular nucleus shape locomotor pattern and rhythm in the freely behaving mouse.*PLoS Biol.* 2019 Apr 24;17(4):e2003880.doi: 10.1371/journal.pbio.2003880. PMID: 31017885; PMCID: PMC6502437.

Li Y., Mathis A., Grewe B. F., Schnitzer M. J., Murthy V. N., Dulac, C. Neuronal representation of social information in the medial amygdala of awake behaving mice. *Cell.* Vol. 171: 1176 – 1190, 2017.<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.015>.

Li Y., Zeng J., Zhang J., Yue C., Zhong W., Liu Z., Feng Q., Luo M. Hypothalamic Circuits for Predation and Evasion. *Neuron*. 2018 Feb 21;97(4):911-924.e5.doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.005. Epub 2018 Feb 1. PMID: 29398361.

Liu D., Li S., Ren L., Liu X., Li X., Wang Z. Different coding characteristics between flight and freezing in dorsal periaqueductal gray of mice during exposure to innate threats. *Animal Model Exp Med*. 2022 Dec;5(6):491-501.doi: 10.1002/ame2.12276. Epub 2022 Oct 12. PMID: 36225094; PMCID: PMC9773308.

Liu M., Kim D.W., Zeng H., Anderson D.J. Make war not love: The neural substrate underlying a state-dependent switch in female social behavior. *Neuron*. 2022 Mar 2;110(5):841-856.e6.doi: 10.1016/j.neuron.2021.12.002. Epub 2022 Jan 3. PMID: 34982958; PMCID: PMC8897222.

Lo L., Yao S., Kim D.W., Cetin A., Harris J., Zeng H., Anderson D.J., Weissbourd B. Connectional architecture of a mouse hypothalamic circuit node controlling social behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Apr 9;116(15):7503-7512.doi: 10.1073/pnas.1817503116. Epub 2019 Mar 21. PMID: 30898882; PMCID: PMC6462064

Lloyd D. R., Murphy A. Z. The role of the Periaqueductal Gray in the Modulation of Pain in Males and Females: Are the Anatomy and Physiology Really that Different?. *Neural Plasticity*. 2009 Jan 28. 2009;2009:462879.doi: 10.1155/2009/462879. PMID: 19197373 ; PMCID: PMC2633449.

Lueptow L.M., Fakira A.K., Bobeck E.N. The Contribution of the Descending Pain Modulatory Pathway in Opioid Tolerance. *Front Neurosci*. 2018 Nov 27;12:886.doi: 10.3389/fnins.2018.00886. PMID: 30542261; PMCID: PMC6278175.

Lyons M. R., West, A. E. Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription. *Progress in Neurobiology*. Vol. 94: 259-295, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.05.003>.

Ma J., du Hoffmann J., Kindel M., Beas B.S., Chudasama Y., Penzo M.A. Divergent projections of the paraventricular nucleus of the thalamus mediate the selection of passive and active defensive behaviors. *Nat Neurosci*. 2021

Oct;24(10):1429-1440.doi: 10.1038/s41593-021-00912-7. Epub 2021 Aug 19. PMID: 34413514; PMCID: PMC8484052.

Mangieri L.R., Jiang Z., Lu Y., Xu Y., Cassidy R.M., Justice N., Xu Y., Arenkiel B.R., Tong Q. Defensive Behaviors Driven by a Hypothalamic-Ventral Midbrain Circuit. *eNeuro*. 2019 Jul 29;6(4):ENEURO.0156-19.2019.doi: 10.1523/ENEURO.0156-19.2019. PMID: 31331938; PMCID: PMC6664144.

Marín-Blasco I. J., Rangel M. J., Baldo M.V.C., Motta S.C., Canteras N. S. The lateral periaqueductal gray and its role in controlling the opposite behavioral choices of predatory hunting and social defense.

Martinez M., Calvo-Torrent A., Herbert J. Mapping brain response to social stress in rodents with c-fos expression: a review. *The International Journal of the Biology of Stress*. Vol. 5(1): 3-13, 2002.<https://doi.org/10.1080/102538902900012369>.

Martinon D., Lis P., Roman A.N., Tornesi P., Applebey S.V., Buechner G., Olivera V., Dabrowska J. Oxytocin receptors in the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis (BNST) bias fear learning toward temporally predictable cued fear. *Transl Psychiatry*. 2019 Apr 18;9(1):140.doi: 10.1038/s41398-019-0474-x. PMID: 31000694; PMCID: PMC6472379.

Miczek K. A. A new test for aggression in rats without aversive stimulation: Differential effects of d-amphetamine and cocaine. *Psychopharmacology*. Vol. 60: 253-259, 1979. <https://doi.org/10.1007/BF00426664>.

Morinaga R., Nakamuta N., Yamamoto Y. Serotonergic projections to the ventral respiratory column from raphe nuclei in rats. *Neurosci Res*. 2019 Jun;143:20-30.doi: 10.1016/j.neures.2018.05.004. Epub 2018 May 24. PMID: 29803764.

Motta S.C., Goto M., Gouveia F.V., Baldo M.V., Canteras N.S., Swanson L.W. Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 24;106(12):4870-5.doi: 10.1073/pnas.0900939106. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19273843; PMCID: PMC2660765.

Motta S.C., Canteras N.S. Restraint stress and social defeat: What they have in common. *Physiol Behav*. 2015 Jul 1;146:105-110.doi: 10.1016/j.physbeh.2015.03.017. PMID: 26066716.

Olivera-Pasilio V., Dabrowska J. Oxytocin Promotes Accurate Fear Discrimination and Adaptive Defensive Behaviors. *Front Neurosci.* 2020 Sep 23;14:583878.doi: 10.3389/fnins.2020.583878. PMID: 33071751; PMCID: PMC7538630.

Olson, R. S., Hintze A., Dyer F. C., Knoester D. B., Adami, C. Predator confusion is sufficient to evolve swarming behaviour. *Journal of Royal Society, Interface.* Vol.10 (85): 1-8, 2013. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2013.0305>.

Pan Y., Zhu Q., Wang X., Chen J., Wen B., Zhang Z., Wang Z. Agonistic behaviors and neuronal activation in sexually naïve female Mongolian gerbils. *Behav Brain Res.* 2020 Oct 1;395:112860.doi: 10.1016/j.bbr.2020.112860. Epub 2020 Aug 13. PMID: 32798594.

Pan Y., Mou Q., Huang Z., Chen S., Shi Y., Ye M., Shao M., Wang Z. Chronic social defeat alters behaviors and neuronal activation in the brain of female Mongolian gerbils. *Behav Brain Res.* 2023 Jun 25;448:114456.doi: 10.1016/j.bbr.2023.114456. Epub 2023 Apr 26. PMID: 37116662.

Paninski L., Cunningham J.P. Neural data science: accelerating the experiment-analysis-theory cycle in large-scale neuroscience. *Curr Opin Neurobiol.* 2018 Jun;50:232-241. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.04.007>.

Patel D., Kas M.J., Chattarji S., Buwalda B. Rodent models of social stress and neuronal plasticity: Relevance to depressive-like disorders. *Behav Brain Res.* 2019 Sep 2;369:111900.doi: 10.1016/j.bbr.2019.111900. Epub 2019 Apr 22. PMID: 31022420.

Rangel M.J. Jr., Baldo M.V., Canteras N.S., Hahn J.D. Evidence of a Role for the Lateral Hypothalamic Area Juxtadorsomedial Region (LHAjd) in Defensive Behaviors Associated with Social Defeat. *Front Syst Neurosci.* 2016 Nov 14;10:92.doi: 10.3389/fnsys.2016.00092. PMID: 27895561; PMCID: PMC5107582.

Reis F.M., Lee J.Y., Maesta-Pereira S., Schuette P.J., Chakerian M., Liu J., La-Vu M.Q., Tobias B.C., Ikebara J.M., Kihara A.H., Canteras N.S., Kao J.C., Adhikari A. Dorsal periaqueductal gray ensembles represent approach and

avoidance states. *Elife*. 2021 May 6;10:e64934.doi: 10.7554/eLife.64934. PMID: 33955356; PMCID: PMC8133778.

Rubenstein D. R., Kealey J. Cooperation, conflict, and the evolution of complex animal societies. *Nature Education Knowledge*. Vol. 3 (10): 78, 2010.

Rufino R. A., Mota-Ortiz S. R., De Lima M. A. X., Baldo M. V. C., Canteras, N. S. The rostradorsal periaqueductal gray influences both innate fear responses and acquisition of fear memory in animals exposed to a live predator. *Brain Structure & Function*. Vol. 224: 1537 – 1551, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01852-6>.

Schweinfurth M.K. The social life of Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Elife*. 2020 Apr 9;9:e54020.doi: 10.7554/eLife.54020. PMID: 32271713; PMCID: PMC7145424.

Simerly R. B., Chang C. Muramatsu, M. Swanson L. W. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol. 294: 76-95, 1990. <https://doi.org/10.1002/cne.902940107>.

Sturman O., von Ziegler L., Schläppi C., Akyol F., Privitera M., Slominski D., Grimm C., Thieren L., Zerbi V., Grewe B., Bohacek J. Deep learning-based behavioral analysis reaches human accuracy and is capable of outperforming commercial solutions. *Neuropsychopharmacology*. 2020 Oct;45(11):1942-1952. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0776-y>.

Swedell, L. Primate Sociality and Social Systems. *Nature Education Knowledge* 3(10):84.

Tassoni Bortoloci J. G., Motta S. C. Failure of AAV retrograde tracer transduction in hypothalamic projections to the periaqueductal gray matter. *Heliyon*. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10243>.

Tovote P., Esposito M. S., Botta P., Chaudun F. Fadok J. P. Markovic M., Wolff S. B. E., Ramakrishnan C., Fenno L., Deisseroth K., Herry C., Arber S., Lüthi A. Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature*. Vol. 534: 206-212, 2016. <https://doi.org/10.1038/nature17996>.

Tsang E., Orlandini C., Sureka R., Crevenna A.H., Perlas E., Prankerd I., Masferrer M.E., Gross C.T. Induction of flight via midbrain projections to the cuneiform nucleus. *PLoS One*. 2023 Feb 16;18(2):e0281464.doi: 10.1371/journal.pone.0281464. PMID: 36795666; PMCID: PMC9934373.

Wang L., Talwar V., Osakada T., Kuang A., Guo Z., Yamaguchi T., Lin D. Hypothalamic Control of Conspecific Self-Defense. *Cell Rep*. 2019 Feb 12;26(7):1747-1758.e5.doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.078. PMID: 30759387; PMCID: PMC6431082.

Wang W., Schuette P.J., La-Vu M.Q., Torossian A., Tobias B.C., Ceko M., Kragel P.A., Reis F.M., Ji S., Sehgal M., Maesta-Pereira S., Chakerian M., Silva A.J., Canteras N.S., Wager T., Kao J.C., Adhikari A. Dorsal premammillary projection to periaqueductal gray controls escape vigor from innate and conditioned threats. *Elife*. 2021 Sep 1;10:e69178.doi: 10.7554/eLife.69178. PMID: 34468312; PMCID: PMC8457830.

Xie Z., Gu H., Huang M., Cheng X., Shang C., Tao T., Li D., Xie Y., Zhao J., Lu W., Zhang Z., Zhan C., Tang Z., Zhang F., Cao P. Mechanically evoked defensive attack is controlled by GABAergic neurons in the anterior hypothalamic nucleus. *Nat Neurosci*. 2022 Jan;25(1):72-85.doi: 10.1038/s41593-021-00985-4. Epub 2022 Jan 3. PMID: 34980925.

Yu W., Pati D., Pina M.M., Schmidt K.T., Boyt K.M., Hunker A.C., Zweifel L.S., McElligott Z.A., Kash T.L. Periaqueductal gray/dorsal raphe dopamine neurons contribute to sex differences in pain-related behaviors. *Neuron*. 2021 Apr 21;109(8):1365-1380.e5.doi: 10.1016/j.neuron.2021.03.001. Epub 2021 Mar 18. PMID: 33740416; PMCID: PMC9990825.

Zha X., Wang L., Jiao Z.L., Yang R.R., Xu C., Xu X.H. VMHvl-Projecting Vglut1+ Neurons in the Posterior Amygdala Gate Territorial Aggression. *Cell Rep*. 2020 Apr 21;31(3):107517.doi: 10.1016/j.celrep.2020.03.081. PMID: 32320666.

Zhang F, Gradinaru V, Adamantidis AR, Durand R, Airan RD, de Lecea L, Deisseroth K. Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nat Protoc*. 2010 Mar;5(3):439-56.doi:

10.1038/nprot.2009.226. Epub 2010 Feb 18. PMID: 20203662; PMCID:
PMC4503465.

Anexo 1:

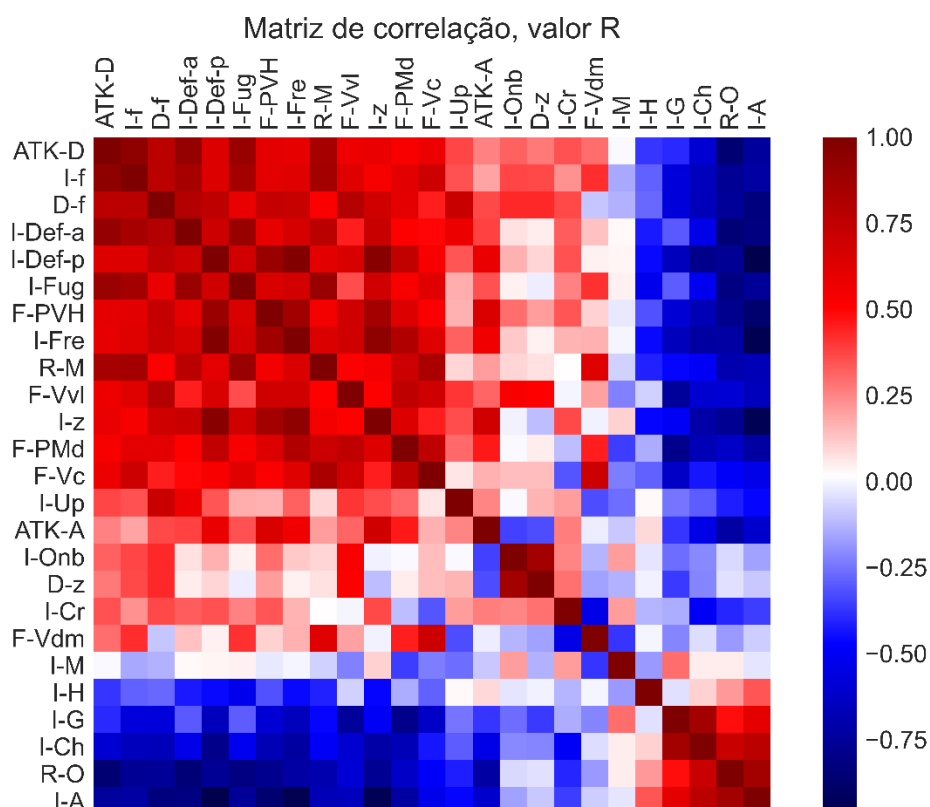


Figura 24: Correlação de matrizes mostrando o coeficiente de correlação através de mapa de cor. As variáveis demonstradas são: F-PVH (Concentração de neurônios c-fos-positivos no núcleo PVH do intruso), F-PMd (Concentração de neurônios c-fos-positivos no núcleo PMd do intruso), F-Vdm (Concentração de neurônios c-fos-positivos no núcleo VMHdm do intruso), F-Vc (Concentração de neurônios c-fos-positivos no núcleo VMHc do intruso), F-Vvl (Concentração de neurônios c-fos-positivos no núcleo VMHvl do intruso), ATK-D(Percentual de ataques diretos realizados pelo dominante), ATK-A(Percentual de ameaças de ataques realizados pelo dominante), R-O(Percentual de outros comportamentos realizados dominante(não agressivos)), R-M(Mordidas realizadas pelo dominante), I-Fre(Percentual de congelamento realizado pelo intruso), I-Cr(Percentual de Crouch sniff realizado pelo intruso), I-Fug(Percentual de fuga realizado pelo intruso), I-Up(Percentual de up-right realizado pelo intruso), I-M(Percentual do tempo mordendo o dominante), I-A(Percentual de ambulação realizado pelo intruso), I-H(Percentual de Rearing realizado pelo intruso), I-Onb(Percentual de On the back realizado pelo intruso), I-G(Percentual de Grooming realizado pelo intruso), I-Def-p(Percentual de CDS passivos realizados pelo intruso), I-Def-a(Percentual de CDS ativos realizado pelo intruso), I-z(Quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi igual a zero), I-f(Quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior que 5mm), D-z(Quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi igual a zero), D-f(Quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior que 5mm). Quanto maior o coeficiente de correlação for, ou seja, mais

próximo de 1, mais vermelha é a cor da cédula. Quanto mais próximo de 0 for o coeficiente, mais próxima de branca será a cor da cédula. Quanto mais próximo de -1 for o coeficiente, mais próxima do azul será a cor da cédula (n=14). [la24]



Figura 25: Em células onde a cor preta estiver presente, foi obtido valor $p < 0.05$ nesta célula, que representa a correlação entre cada uma das variáveis utilizadas. As variáveis demonstradas são: F-PVH (Concentração de neurônios c-fos-positivos no núcleo PVH do intruso), F-PMd (Concentração de neurônios c-fos-positivos no núcleo PMd do intruso), F-Vdm (Concentração de neurônios c-fos-positivos no núcleo VMHdm do intruso), F-Vc (Concentração de neurônios c-fos-positivos no núcleo VMHc do intruso), F-Vvl (Concentração de neurônios c-fos-positivos no núcleo VMHvl do intruso), ATK-D(Percentual de ataques realizados pelo dominante), ATK-A(Percentual de ameaças de ataques realizados pelo dominante), R-O(Percentual de outros comportamentos realizados dominante(não agressivos)), R-M(Mordidas realizadas pelo dominante), I-Fre(Percentual de congelamento realizado pelo intruso), I-Cr(Percentual de Crouch sniff realizado pelo intruso), I-Fug(Percentual de fuga realizado pelo intruso), I-Up(Percentual de up-right realizado pelo intruso), I-M(Percentual do tempo mordendo o dominante), I-A(Percentual de ambulação realizado pelo intruso), I-H(Percentual de Rearing realizado pelo intruso), I-Onb(Percentual de On the back realizado pelo intruso), I-G(Percentual de Grooming realizado pelo intruso), I-Def-p(Percentual de CDS passivos realizados pelo intruso), I-Def-a(Percentual de CDS ativos realizados pelo intruso), I-z(Quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi igual a zero), I-f(Quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior que 5mm), D-z(Quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi igual a zero), D-f(Quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior que 5mm) (n=14). [a25]

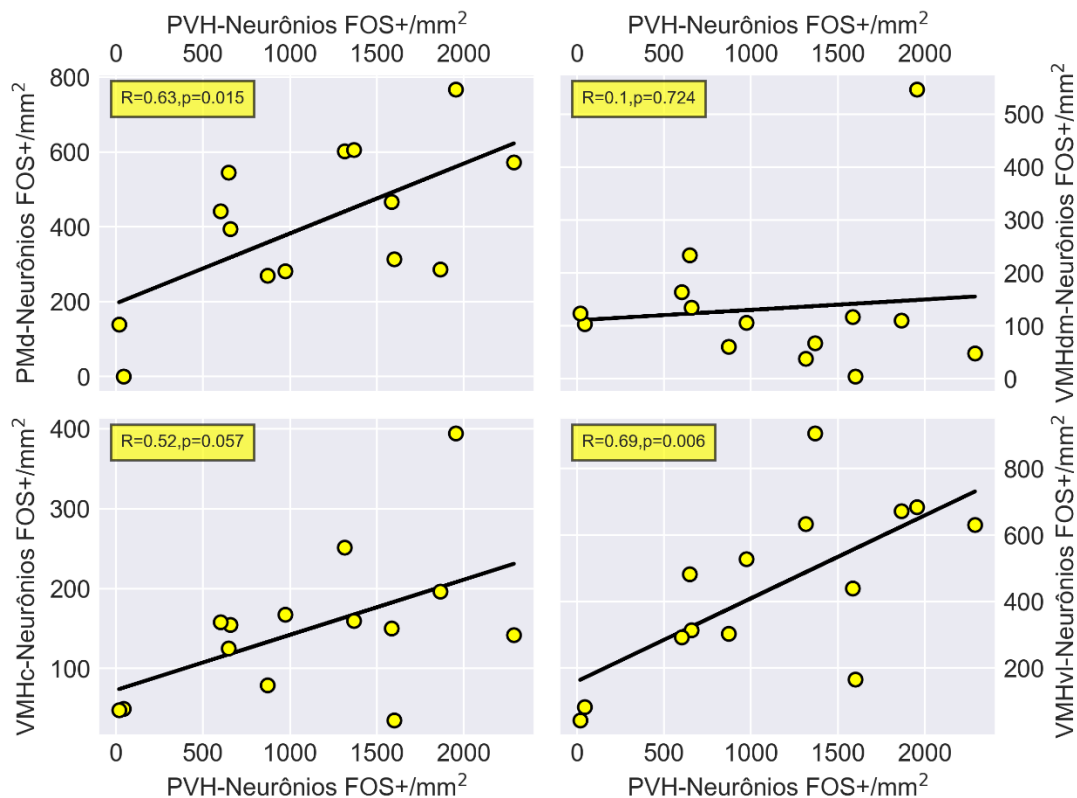


Figura 26: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e PMd ($R=0.63, p=0.015$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e VMHdm ($R=0.1, p=0.724$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e VMHc ($R=0.52, p=0.057$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e VMHvl ($R=0.69, p=0.006$).

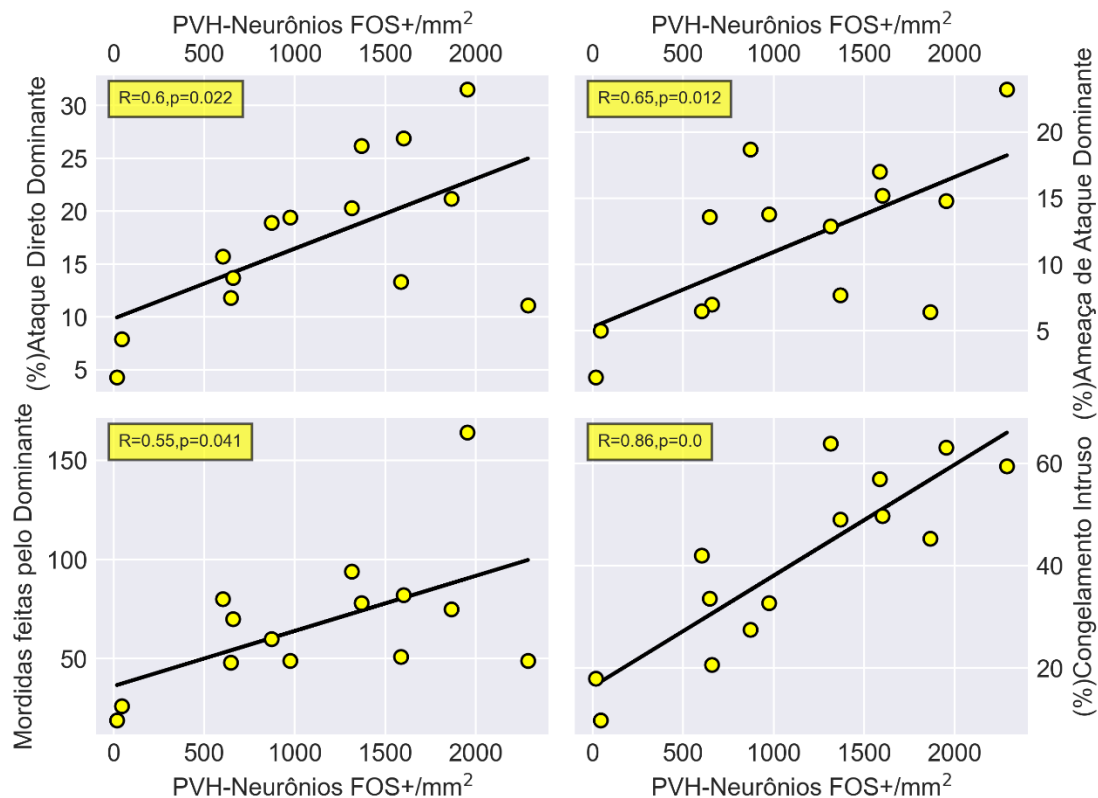


Figura 27: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e percentual de ataques diretos realizados pelo dominante ($R=0.6, p=0.022$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e percentual de ameaças de ataque realizadas pelo dominante ($R=0.65, p=0.012$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e mordidas realizadas pelo dominante ($R=0.55, p=0.041$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e percentual de congelamento realizado pelo intruso ($R=0.86, p < 0.001$). [a27]

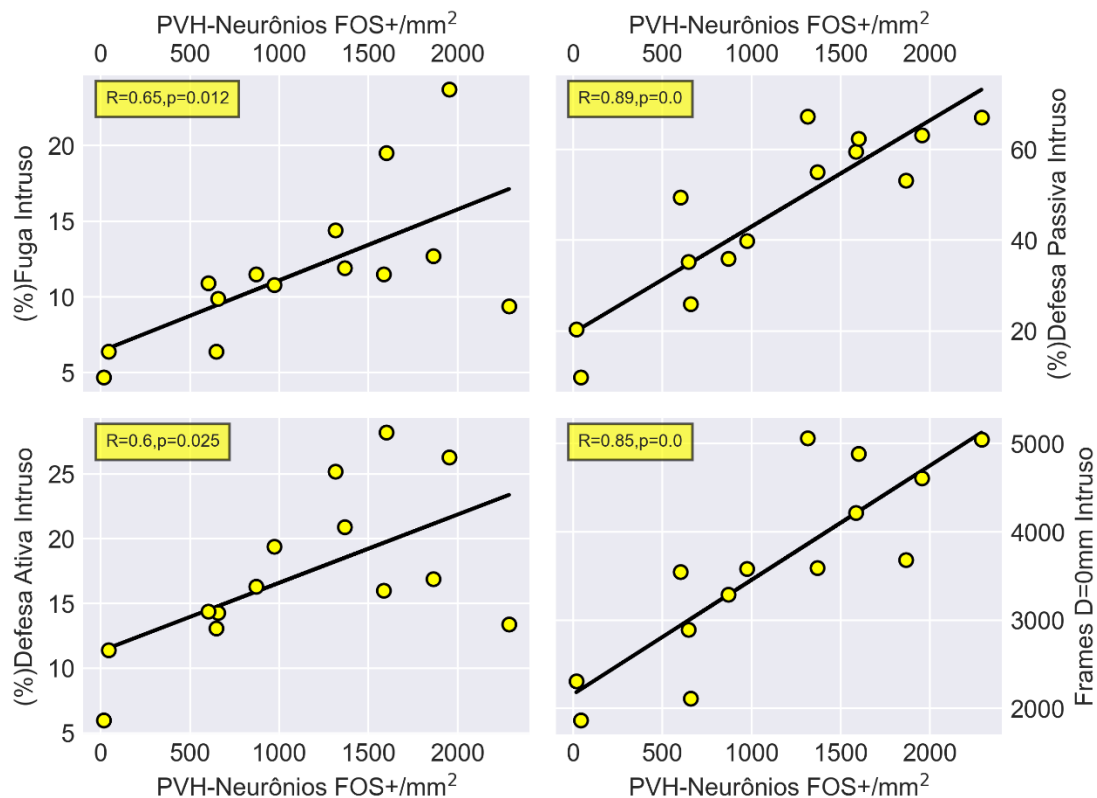


Figura 28: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e percentual de fuga realizado pelo intruso ($R=0.65, p=0.012$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e percentual de defesa passiva realizado pelo intruso ($R=0.89, p=< 0.001$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e percentual de defesa ativa realizado pelo intruso ($R=0.6, p=0.025$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e Frames onde deslocamento do intruso foi igual a zero ($R=0.85, p=< 0.001$). [la28]

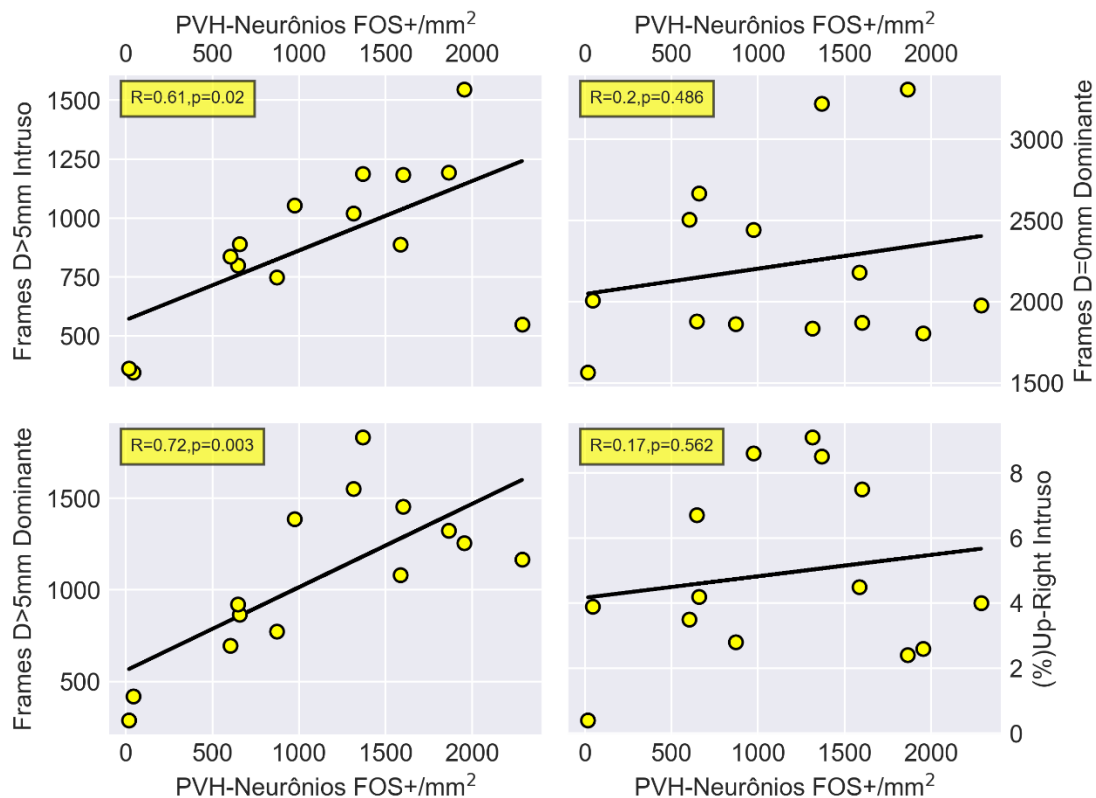


Figura 29: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e quantidade de frames onde houve movimentação maior que 5mm do intruso ($R=0.61, p=0.02$).

Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante ($R=0.2, p=0.486$).

Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e quantidade de frames onde houve movimentação maior que 5mm do dominante ($R=0.72, p=0.003$).

Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e percentual de Up-Right realizado pelo intruso ($R=0.17, p=0.562$). [a29]

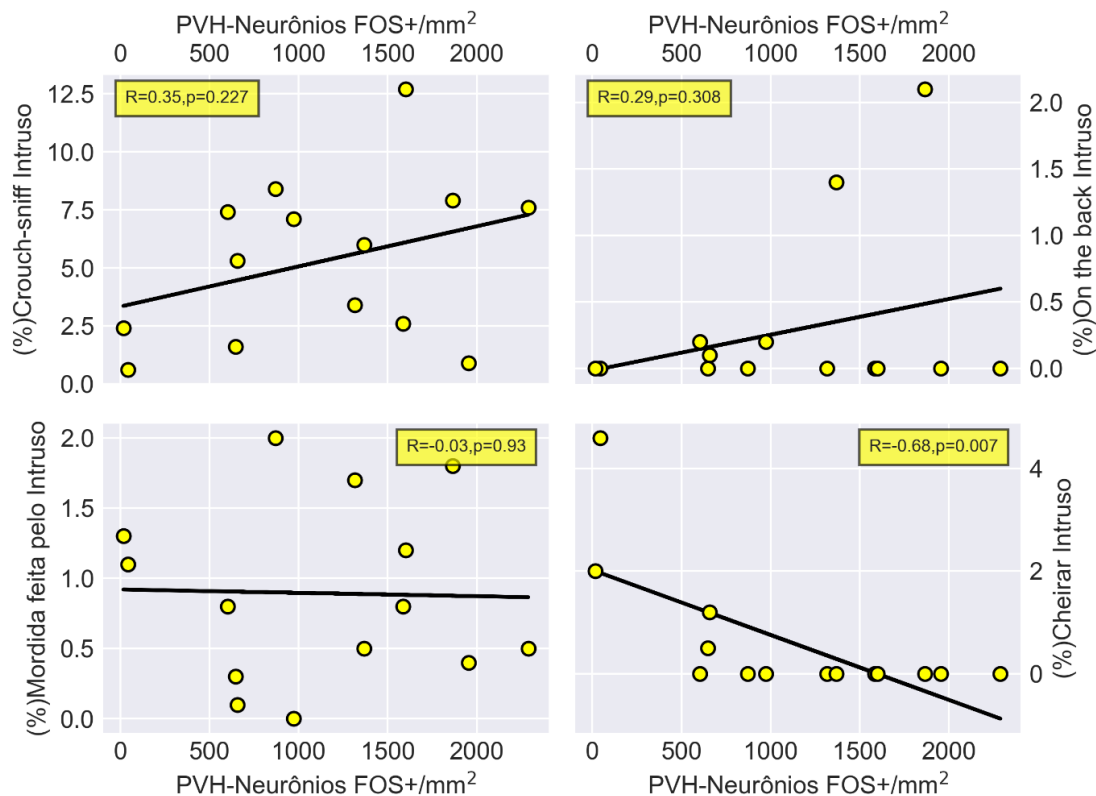


Figura 30: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e percentual de crouch-sniff realizado pelo intruso ($R=0.35, p=0.227$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e percentual em on-the-back realizado pelo intruso ($R=0.29, p=0.308$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e quantidade de mordidas realizadas pelo intruso ($R=-0.03, p=0.93$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e percentual de cheirar dominante realizado pelo intruso ($R=-0.68, p=0.007$). [a30]

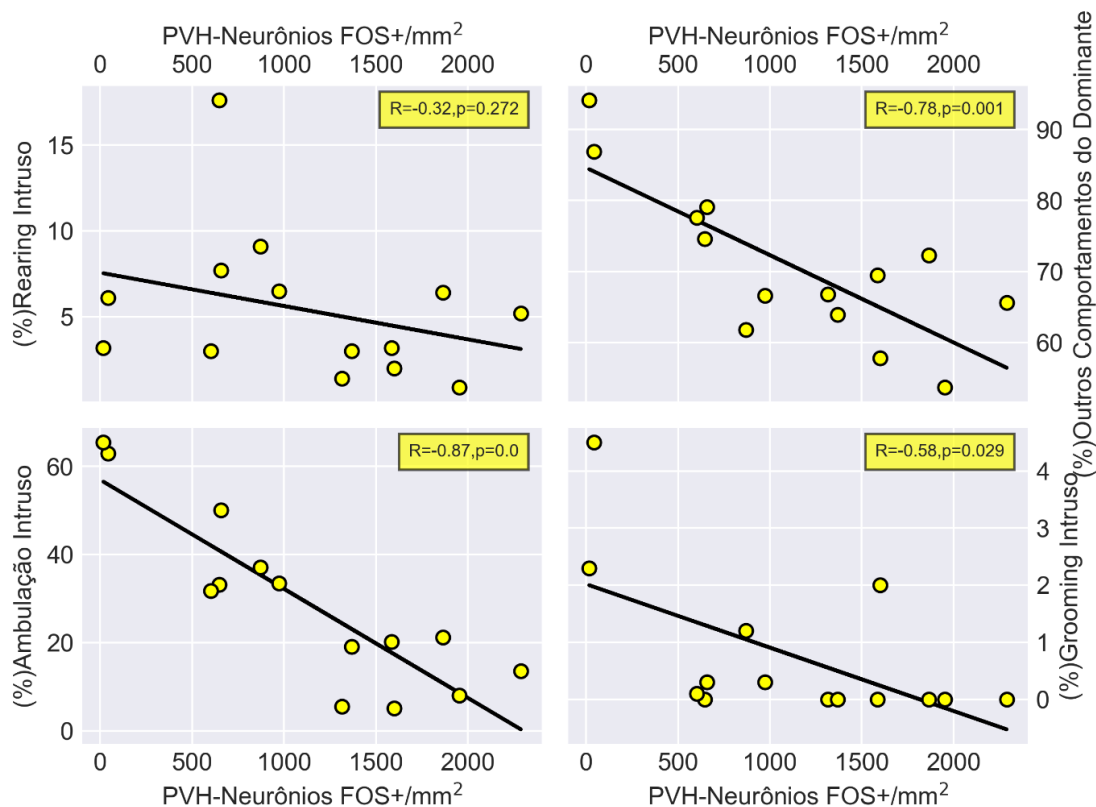


Figura 31: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e percentual de rearing realizado pelo intruso ($R=-0.32, p=0.272$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e percentual de outros comportamentos realizados pelo Dominante (Comportamentos não agressivos) ($R=-0.78, p=0.001$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e percentual de ambulação realizado pelo Intruso ($R=-0.87, p< 0.001$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PVH e percentual de grooming realizado pelo intruso ($R=-0.58, p=0.029$). [a31]

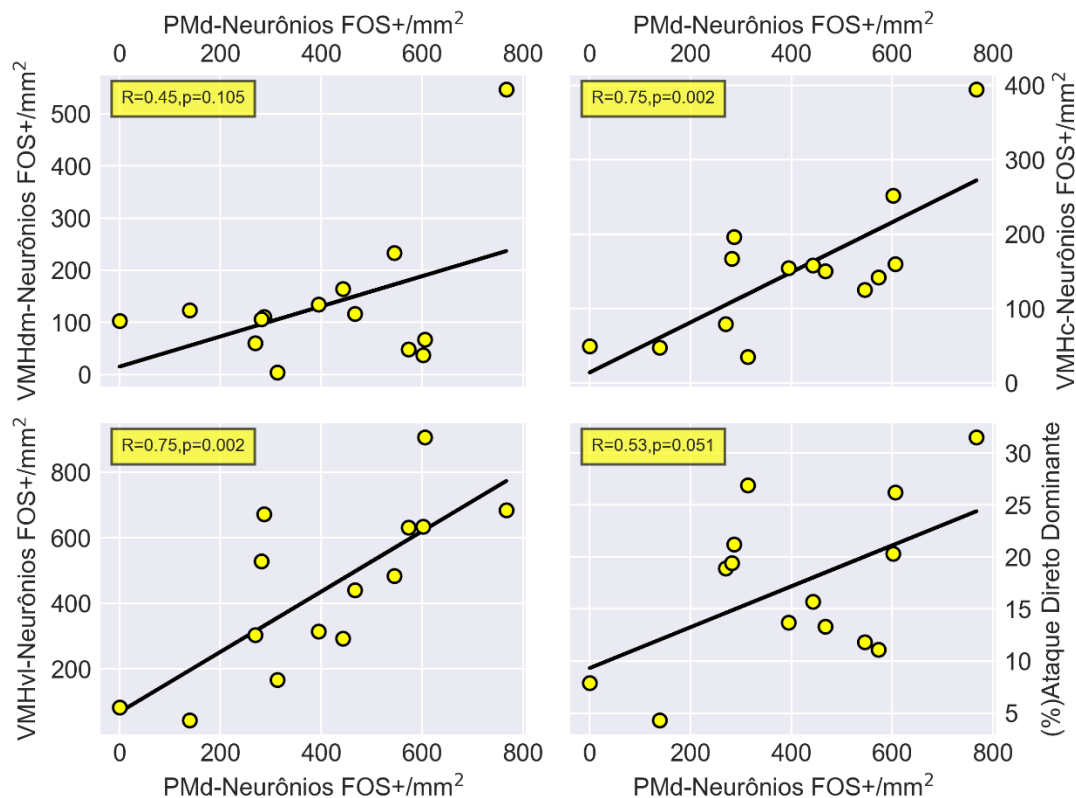


Figura 32: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm ($R=0.45, p=0.105$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e concentração de neurônios no VMHc(Comportamentos não agressivos) ($R=0.75, p=0.002$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl ($R=0.75, p=0.002$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e percentual de ataques diretos realizados pelo dominante($R=0.53, p=0.051$). [la32]

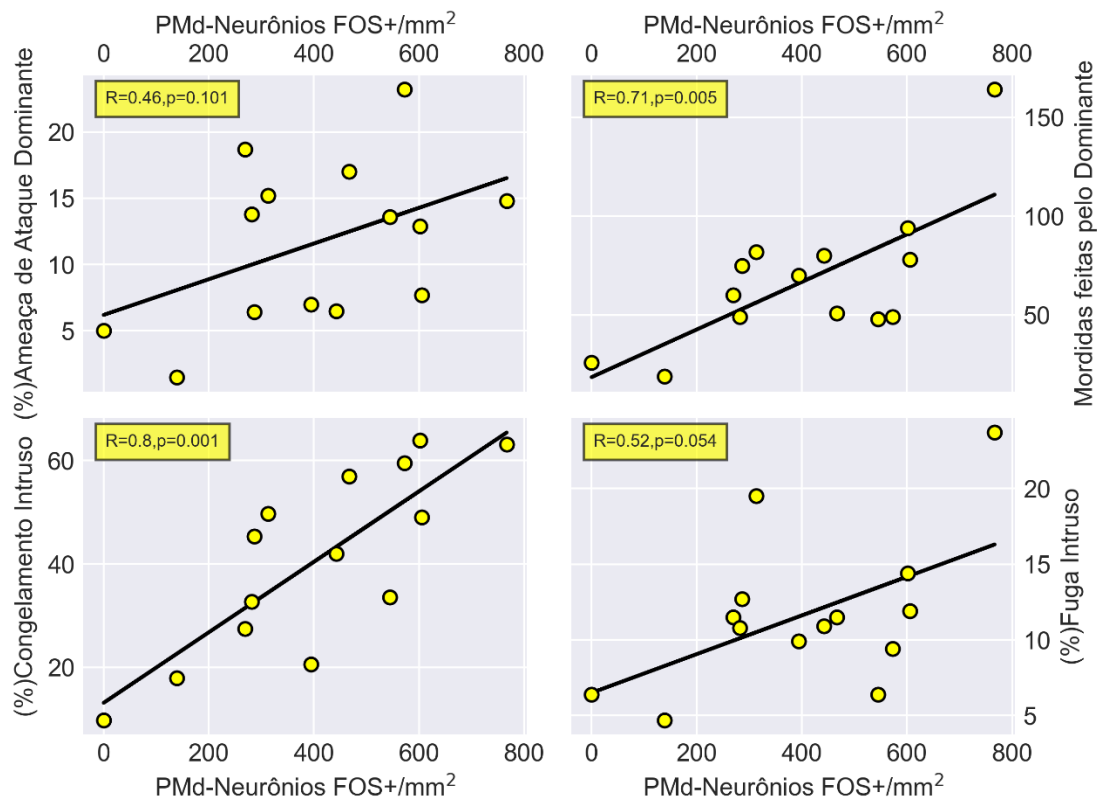


Figura 33: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e percentual de ameaças de ataque realizadas pelo dominante ($R=0.46, p=0.101$).

Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e mordidas realizadas pelo dominante ($R=0.71, p=0.005$).

Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e percentual de congelamento realizado pelo intruso ($R=0.8, p=0.001$).

Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e percentual de fuga realizado pelo intruso ($R=0.52, p=0.054$). [a33]

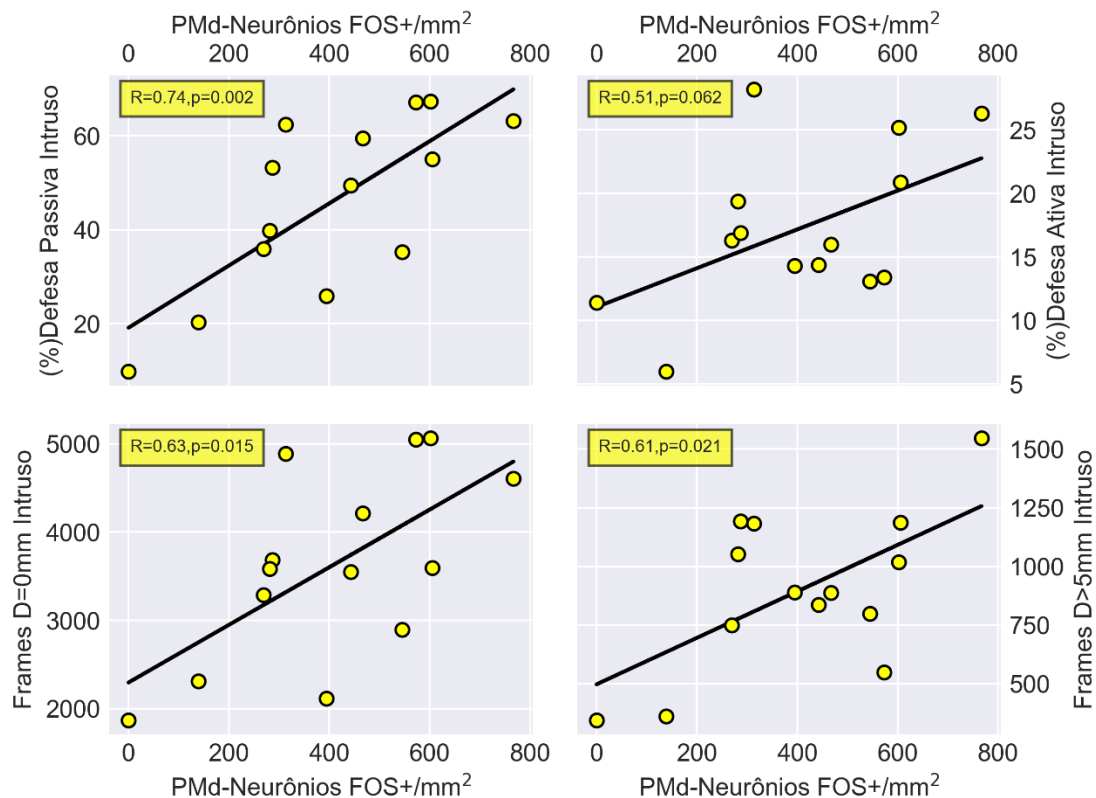


Figura 34: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e percentual de defesa passiva realizado pelo intruso ($R=0.74, p=0.002$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e percentual de defesa ativa realizado pelo intruso ($R=0.51, p=0.0062$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e quantidade frames onde não houve movimentação do intruso ($R=0.63, p=0.015$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e quantidade de frames onde houve movimentação maior do que 5mm ($R=0.61, p=0.021$). [la34]

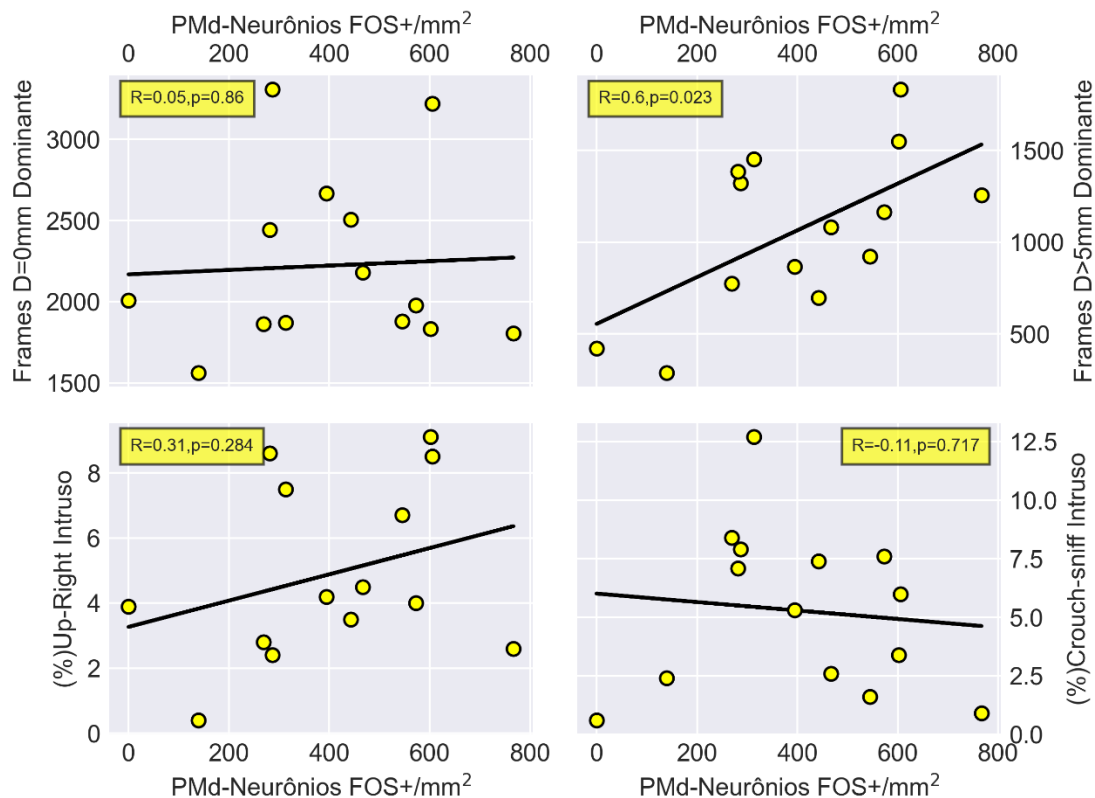


Figura 35: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante ($R=0.05$, $p=0.86$).

Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e quantidade de frames onde houve movimentação maior que 5mm pelo dominante ($R=0.6$, $p=0.023$).

Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e percentual de Up-Right realizado pelo intruso ($R=0.31$, $p=0.284$).

Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e percentual de crouch-sniff realizado pelo intruso ($R=-0.11$, $p=0.717$). [a35]

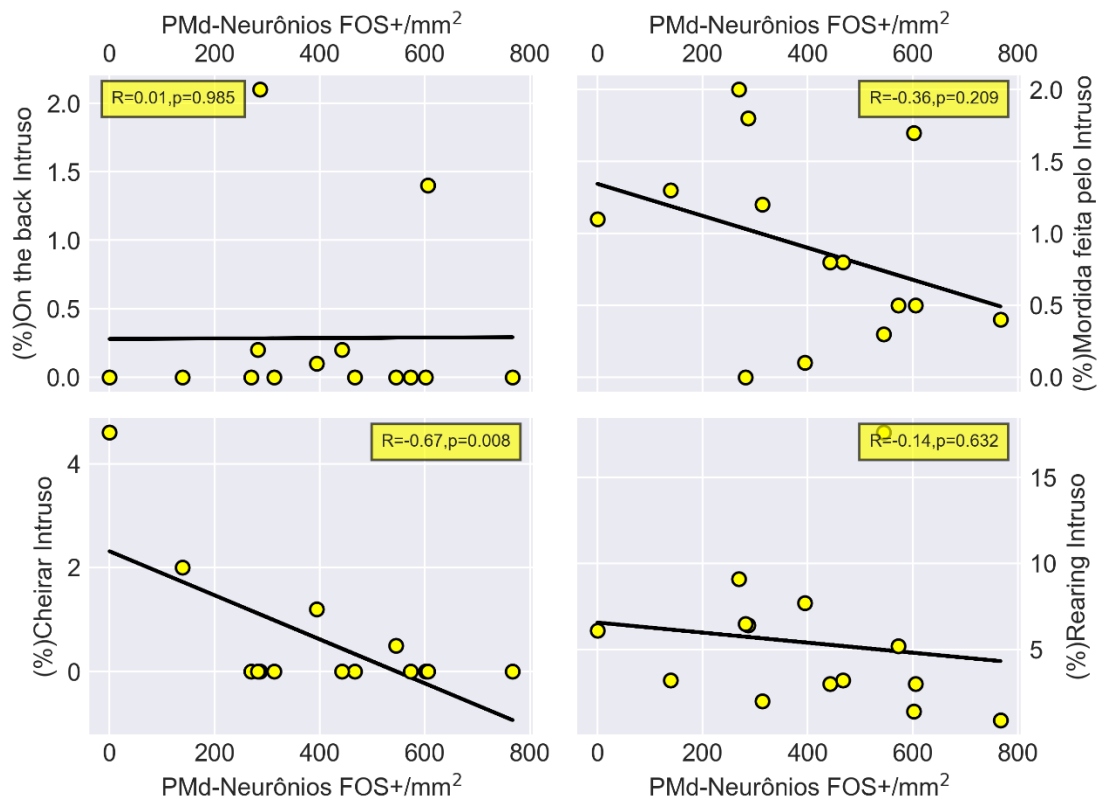


Figura 36: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e percentual de on the back realizado pelo intruso ($R=0.01, p=0.98$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e mordidas realizadas pelo intruso ($R=-0.36, p=0.209$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e percentual de cheirar o dominante ($R=-0.67, p=0.008$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e percentual de rearing realizado intruso ($R=-0.14, p=0.632$). [la36]

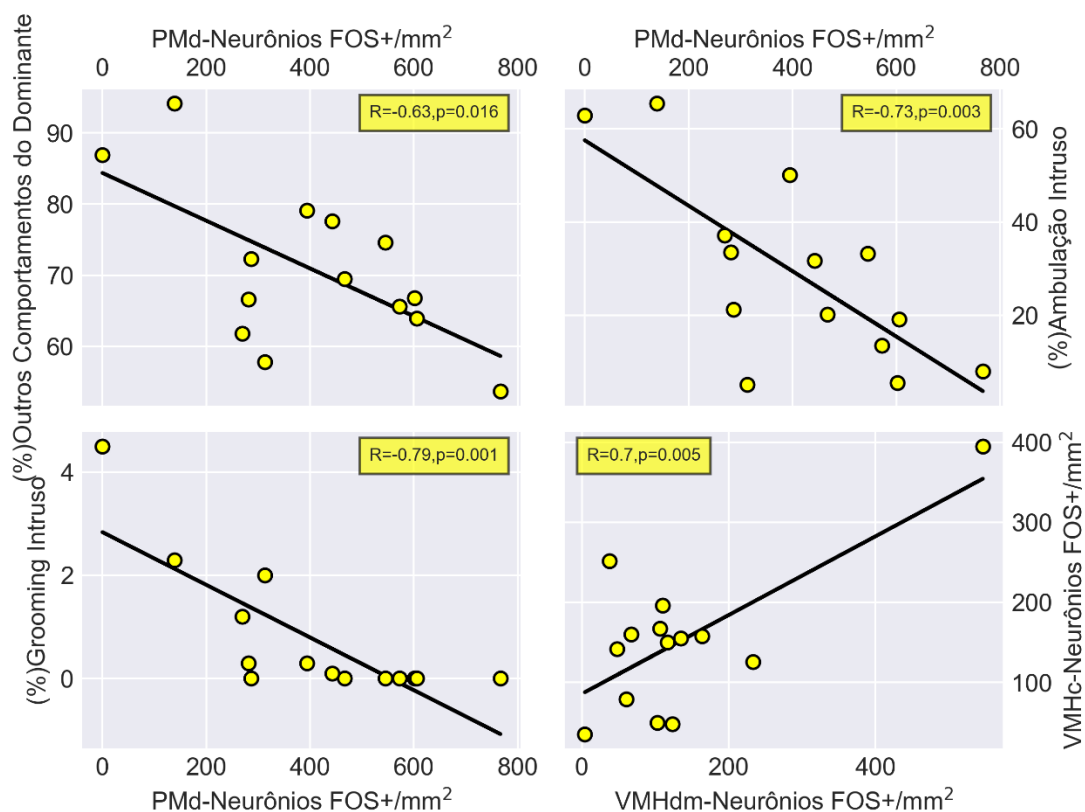


Figura 37: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e percentual de outros comportamentos realizados pelo dominante ($R = -0.63, p = 0.016$).

Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e ambulação realizada pelo intruso ($R = -0.73, p = 0.003$).

Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no PMd e percentual de Grooming realizado pelo intruso ($R = -0.79, p = 0.001$).

Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc ($R = 0.7, p = 0.005$). [la37]

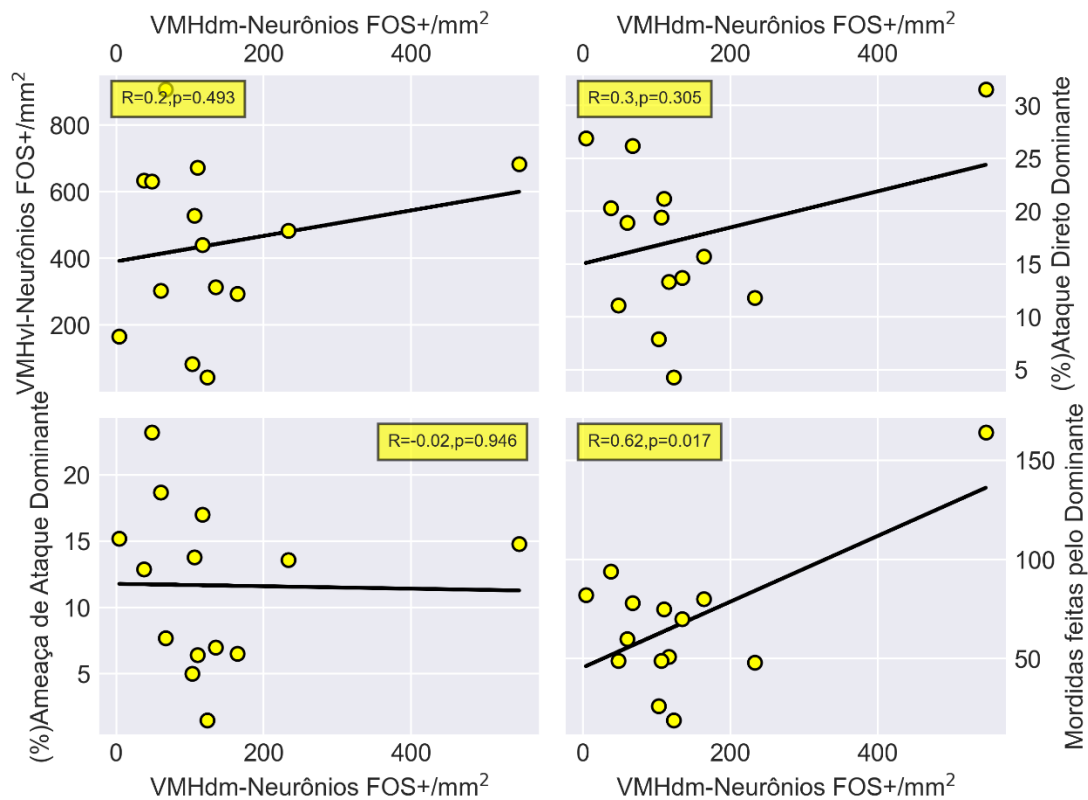


Figura 38: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl ($R=0.2, p=0.493$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e percentual de Ataques diretos realizados pelo Dominante ($R=0.3, p=0.305$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e percentual de ameaças de ataque do dominante ($R=-0.02, p=0.946$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e mordidas realizadas realizadas pelo dominante ($R=0.62, p=0.017$). [la38]

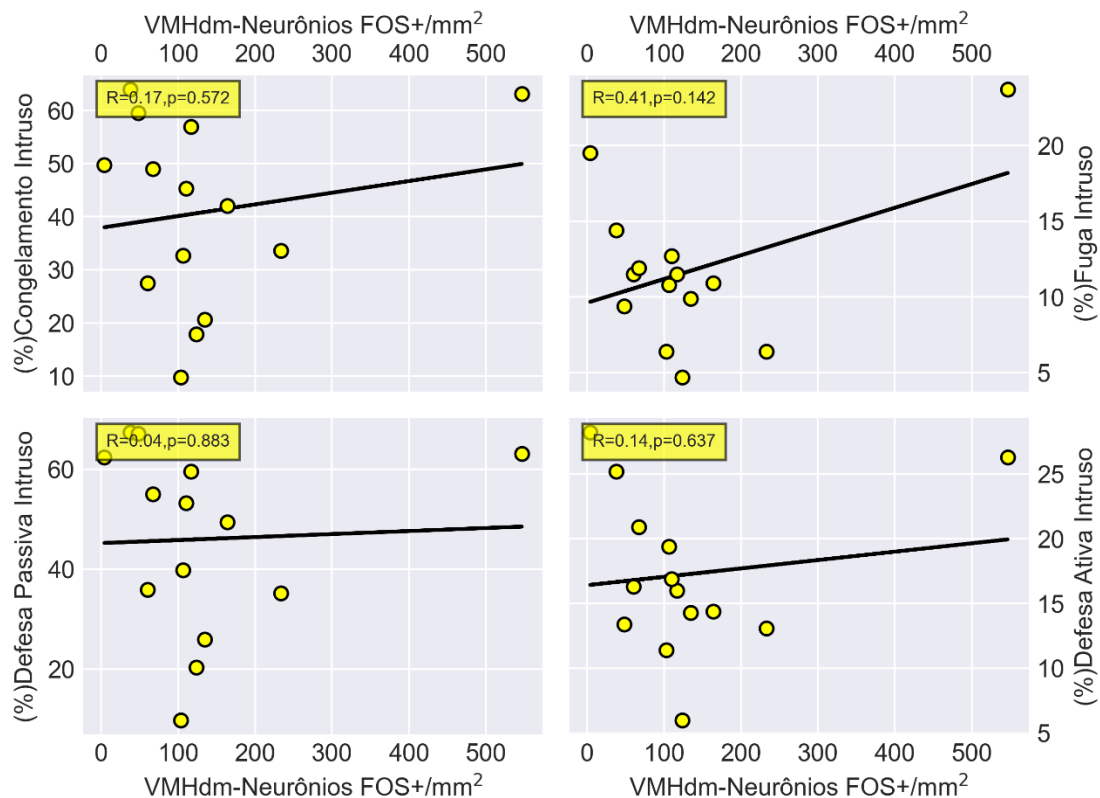


Figura 39: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e percentual de congelamento realizado pelo intruso ($R=0.17, p=0.572$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e percentual de Fuga realizada pelo Intruso ($R=0.41, p=0.142$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e percentual de defesa passiva realizada pelo Intruso ($R=0.04, p=0.883$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e percentual de defesa ativa realizada pelo intruso ($R=0.14, p=0.63$). [la39]

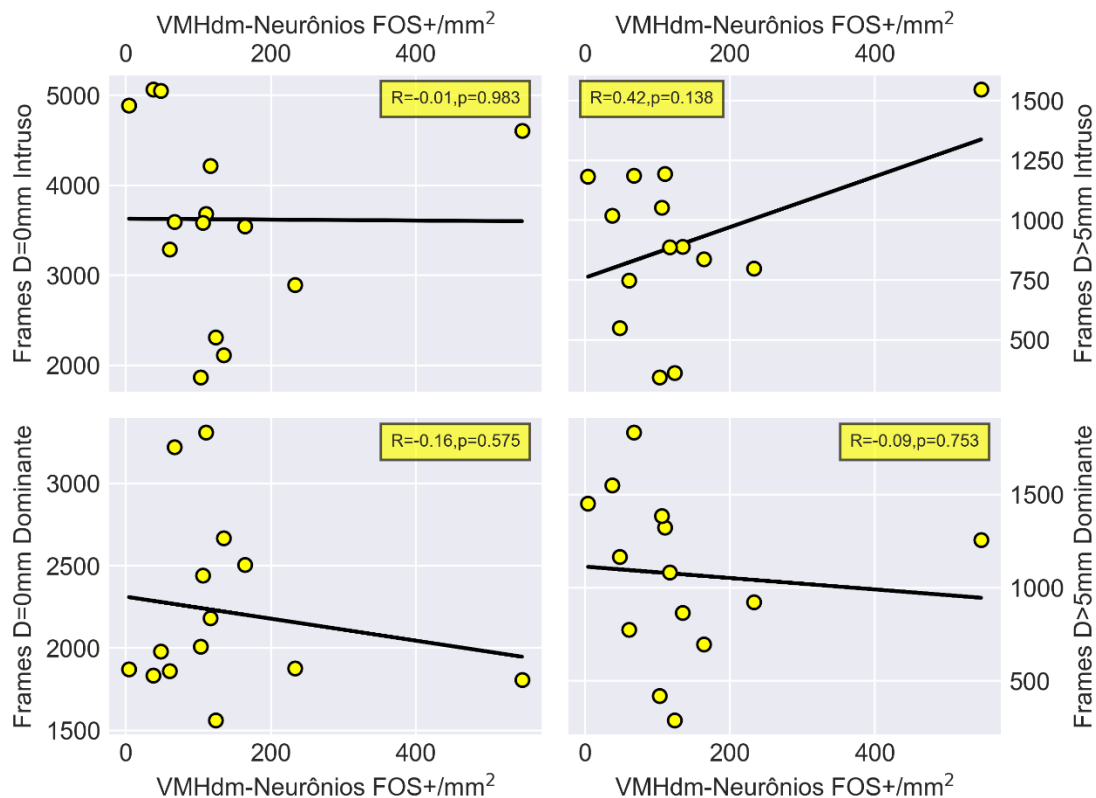


Figura 40: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso ($R=-0.01, p=0.983$).

Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e quantidade de frames onde houve movimentação maior que 5mm pelo intruso ($R=0.42, p=0.138$).

Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante ($R=-0.16, p=0.575$).

Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e quantidade de frames com movimentação maior que 5mm pelo dominante ($R=-0.09, p=0.753$). [la40]

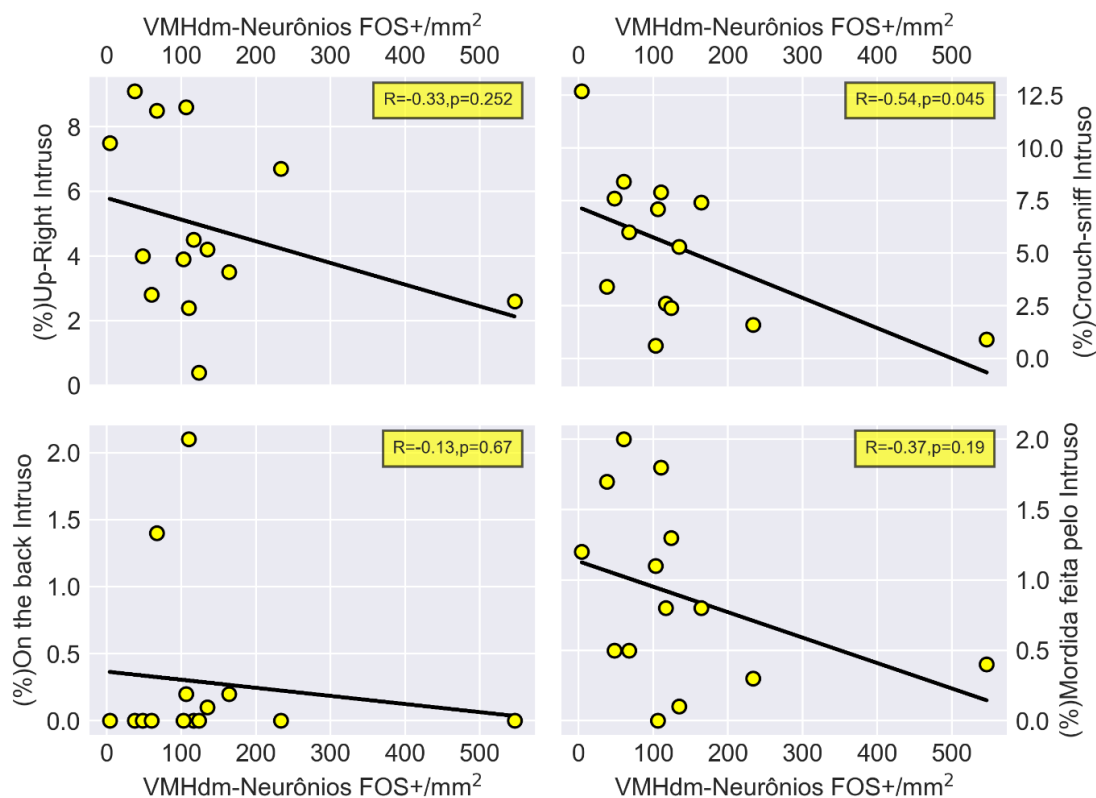


Figura 41: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e Up-Right realizado pelo intruso ($R = -0.33, p = 0.252$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e percentual crouch-sniff realizado pelo intruso ($R = -0.54, p = 0.045$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e On the back realizado pelo Intruso ($R = -0.13, p = 0.67$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e quantidade de mordidas realizadas pelo intruso ($R = -0.37, p = 0.19$). [la41]

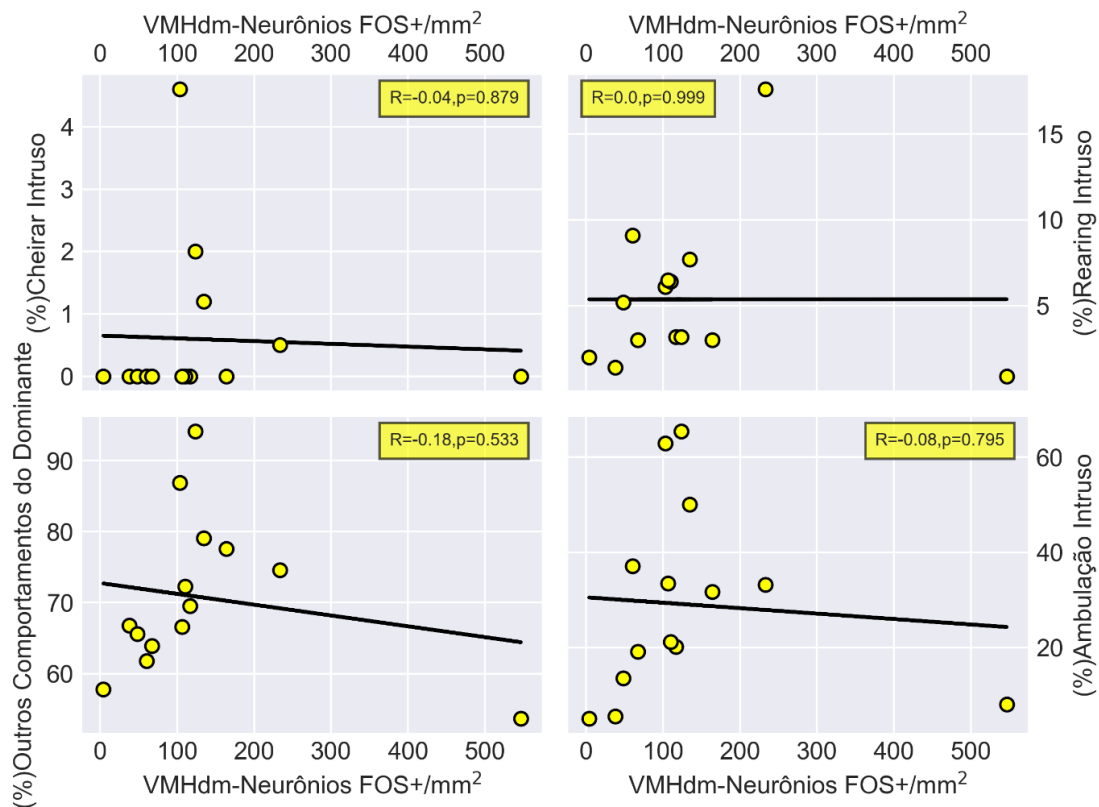


Figura 42: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e percentual do tempo cheirando o dominante ($R=-0.04, p=0.879$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e percentual crouch-sniff realizado pelo intruso ($R=-0.54, p=0.045$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e percentual de outros comportamentos realizados pelo dominante ($R=-0.18, p=0.533$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e percentual de ambulação realizado pelo intruso ($R=-0.08, p=0.795$). [a42]

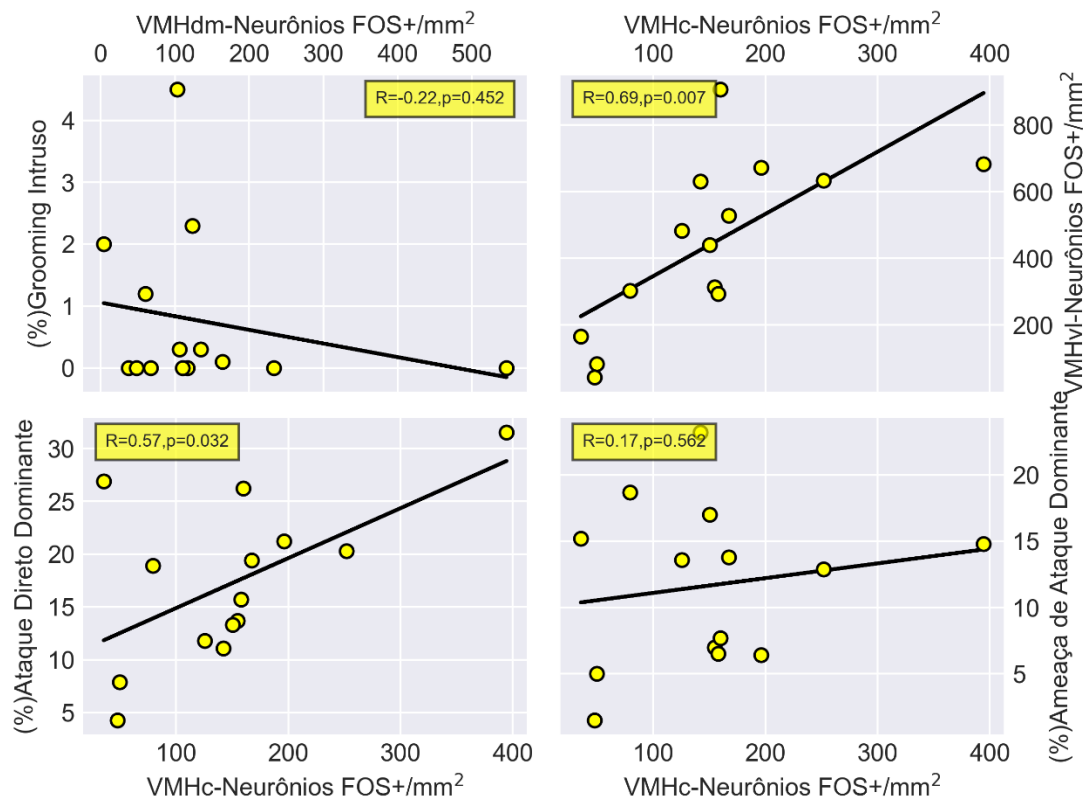


Figura 43: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHdm e percentual do tempo realizando Grooming pelo intruso ($R = -0.22, p = 0.452$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl ($R = -0.54, p = 0.045$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e percentual de ataques diretos realizados pelo dominante ($R = 0.57, p = 0.032$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e percentual de ameaça de ataque realizado pelo dominante ($R = 0.17, p = 0.562$). [la43]

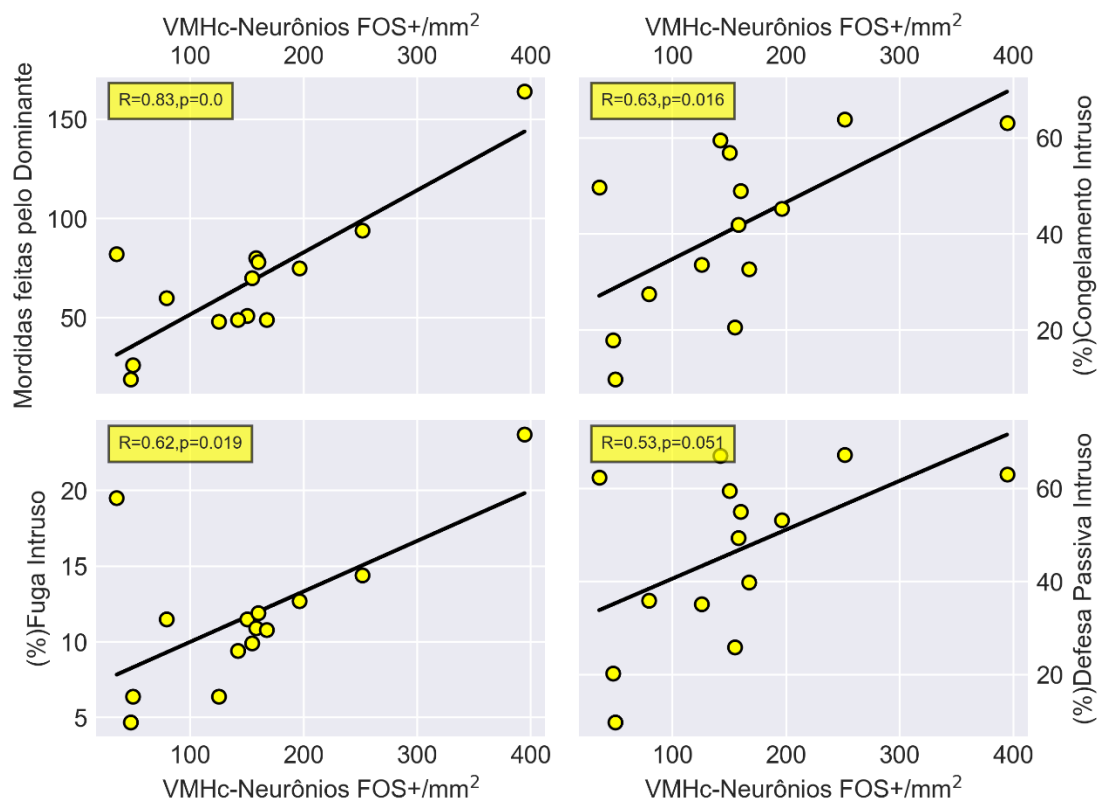


Figura 44: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e mordidas realizadas pelo dominante ($R=0.83, p<0.001$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e percentual de congelamento realizado pelo intruso ($R=0.63, p=0.016$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e percentual de fuga realizado pelo intruso ($R=0.62, p=0.019$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e percentual de defesa passiva realizado pelo intruso ($R=0.53, p=0.019$). [la44]

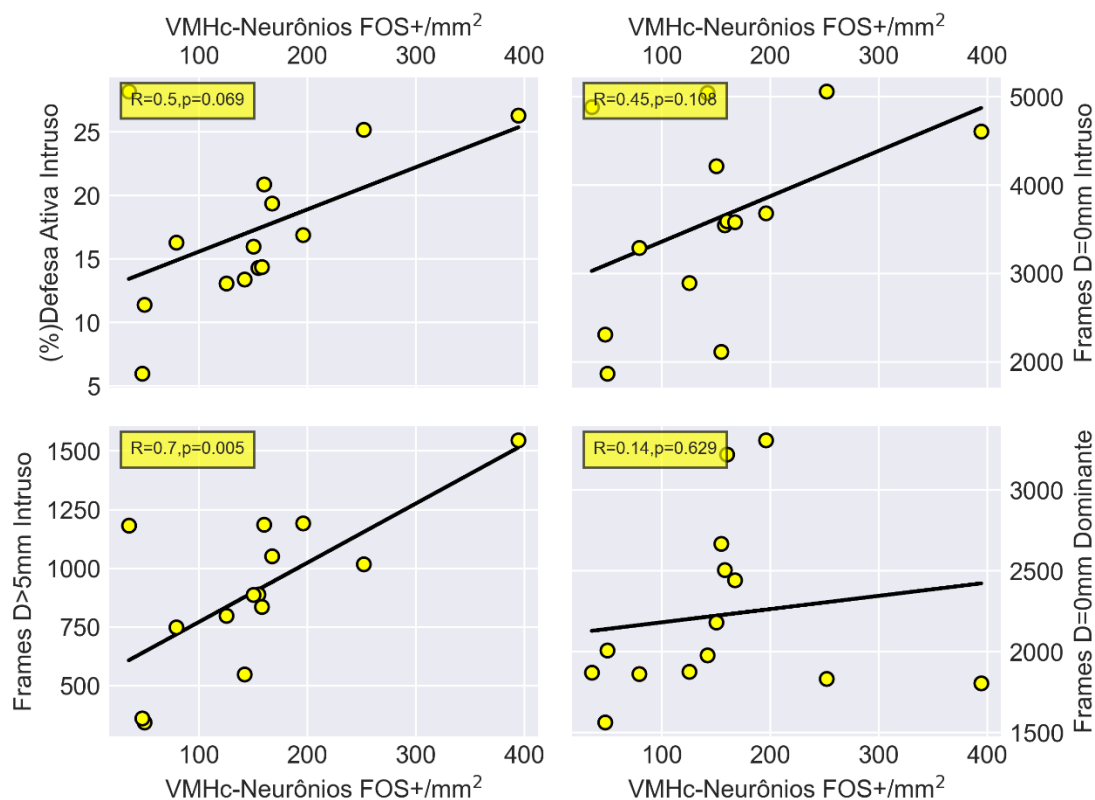


Figura 45: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e percentual do tempo realizando defesa ativa pelo intruso ($R=0.5$, $p=0.09$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso ($R=0.45$, $p=0.108$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e quantidade de frames onde o deslocamento do intruso foi maior que 5 mm ($R=0.7$, $p=0.005$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante ($R=0.14$, $p=0.629$). [a45]

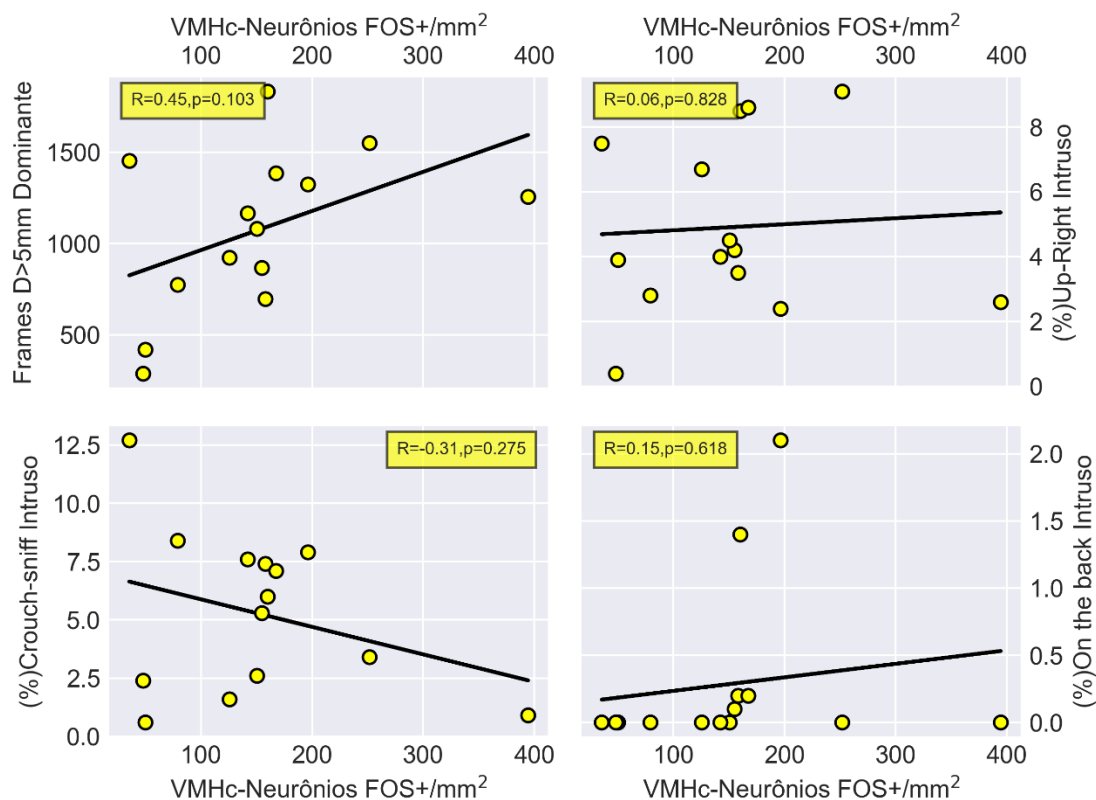


Figura 46: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior que 5mm($R=0.45$, $p=0.103$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e percentual de Up-Right do intruso($R=0.06$, $p=0.828$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e percentual de Crouch-sniff realizado pelo intruso($R=-0.31$, $p=0.275$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e percentual de On the back realizado pelo intruso($R=0.15$, $p=0.618$). [a46]

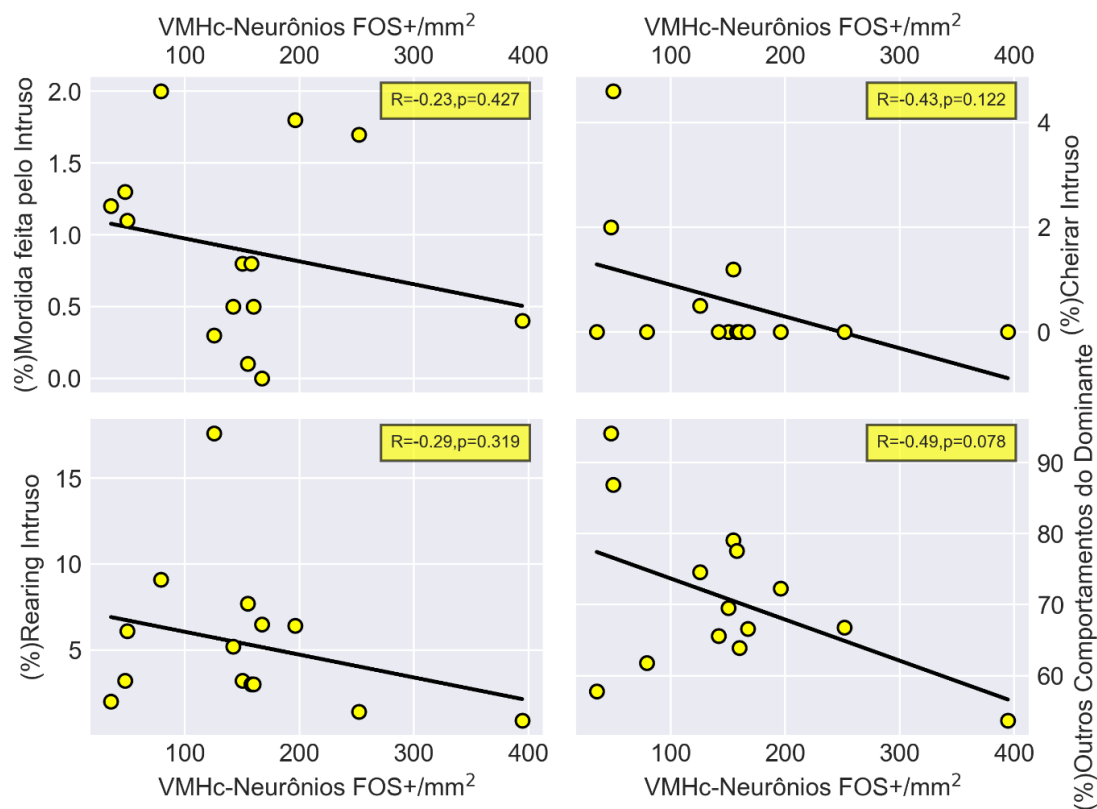


Figura 47: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e mordidas realizadas pelo intruso ($R=-0.23$, $p=0.427$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e percentual do tempo cheirando o dominante ($R=-0.43$, $p=0.122$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e percentual do tempo realizando rearing realizado pelo intruso ($R=-0.29$, $p=0.319$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e Outros comportamentos (não agressivos) realizados pelo dominante ($R=-0.49$, $p=0.078$). [a47]

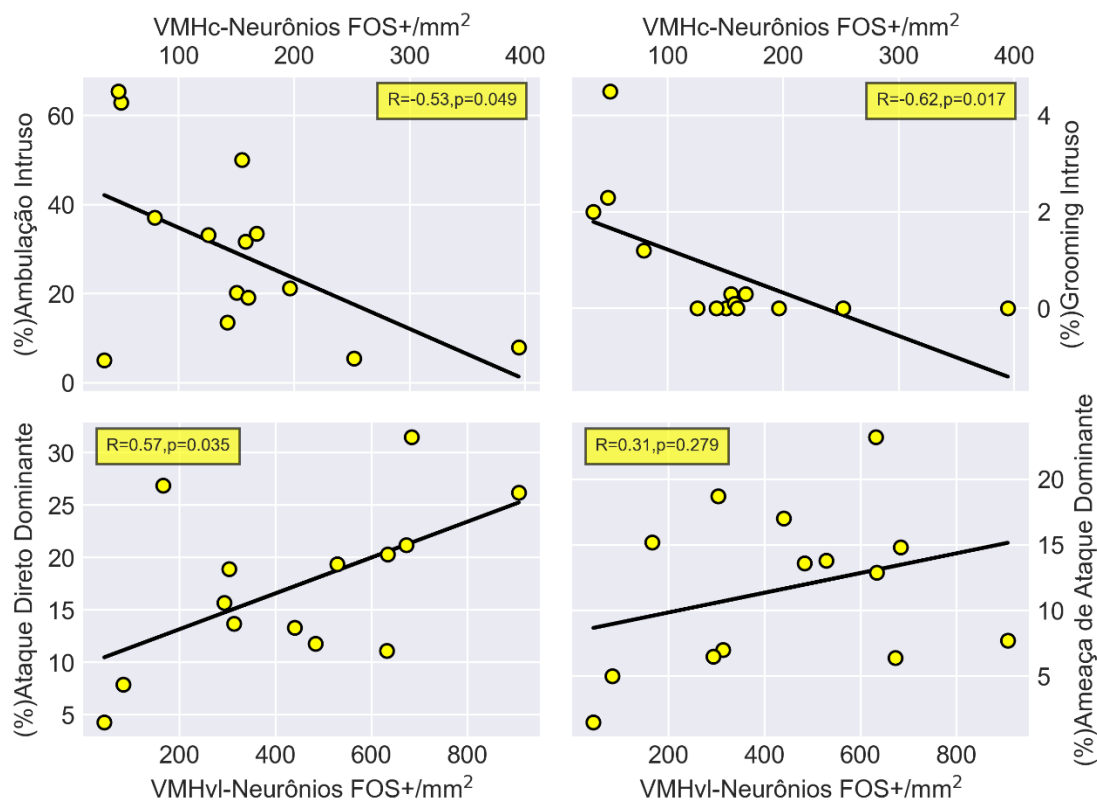


Figura 48: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e percentual de ambulação realizado pelo intruso ($R=-0.53$, $p=0.049$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e percentual do tempo realizando Grooming pelo intruso ($R=-0.62$, $p=0.017$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e percentual do tempo realizado ataques diretos pelo dominante ($R=0.57$, $p=0.035$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e percentual de ameaça de ataque realizado pelo dominante ($R=0.31$, $p=0.279$). [la48]

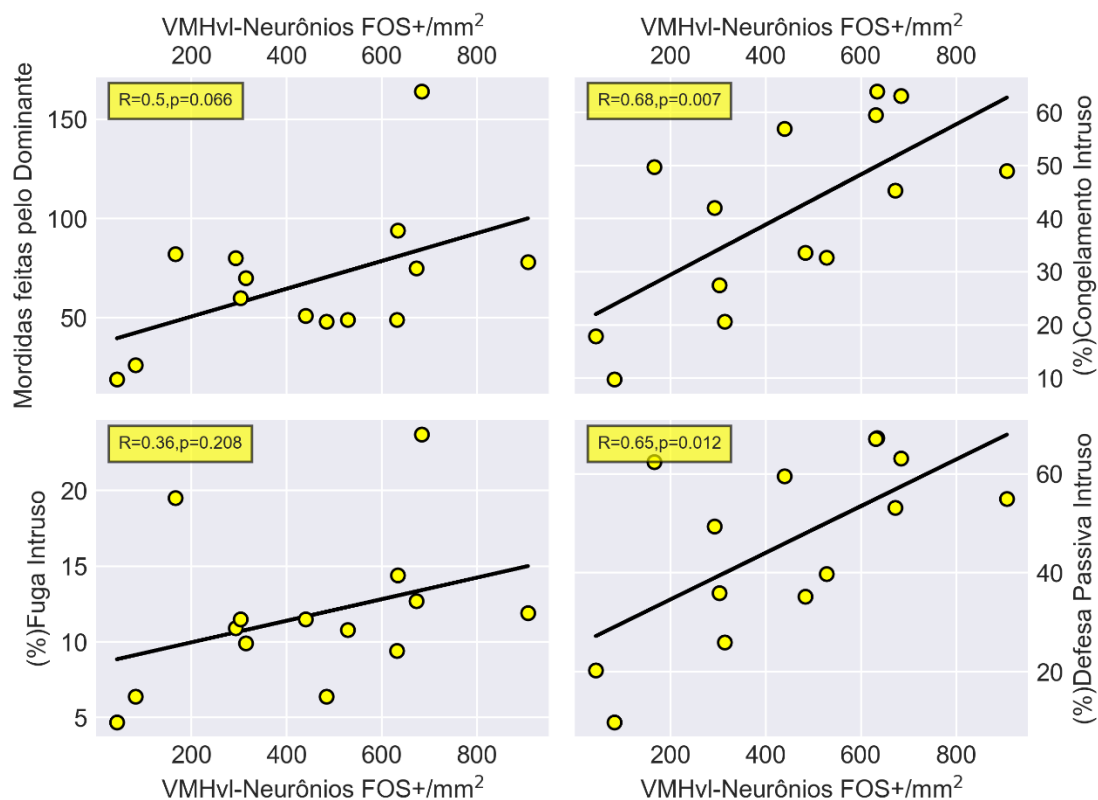


Figura 49: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e quantidade mordidas realizadas pelo dominante ($R=0.5, p=0.06$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHc e percentual do tempo realizando congelamento pelo intruso ($R=0.68, p=0.007$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e percentual do tempo realizado fuga pelo intruso ($R=0.36, p=0.208$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e percentual de defesa ativa realizada pelo Intruso ($R=0.65, p=0.012$). [a49]

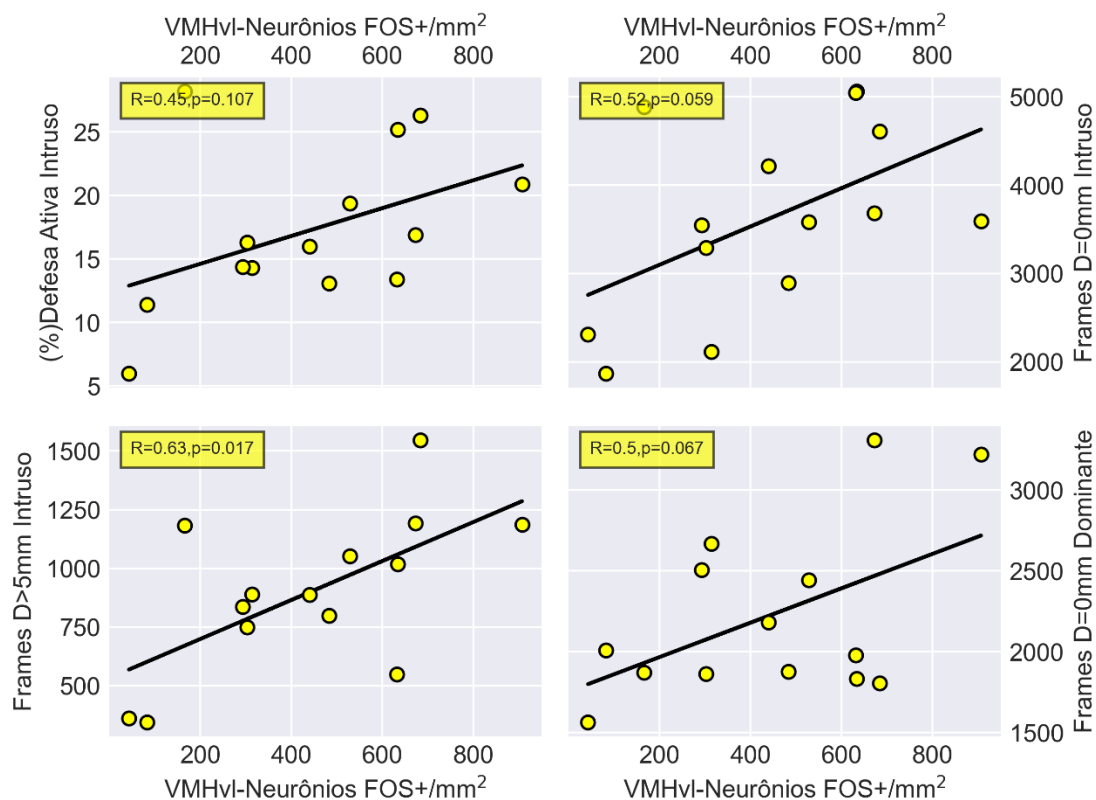


Figura 50: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e percentual do tempo realizado defesa ativa pelo intruso ($R=0.45, p=0.107$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e quantidade de frames sem deslocamento do intruso ($R=0.52, p=0.059$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior que 5mm ($R=0.63, p=0.017$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante ($R=0.5, p=0.067$). [la50]

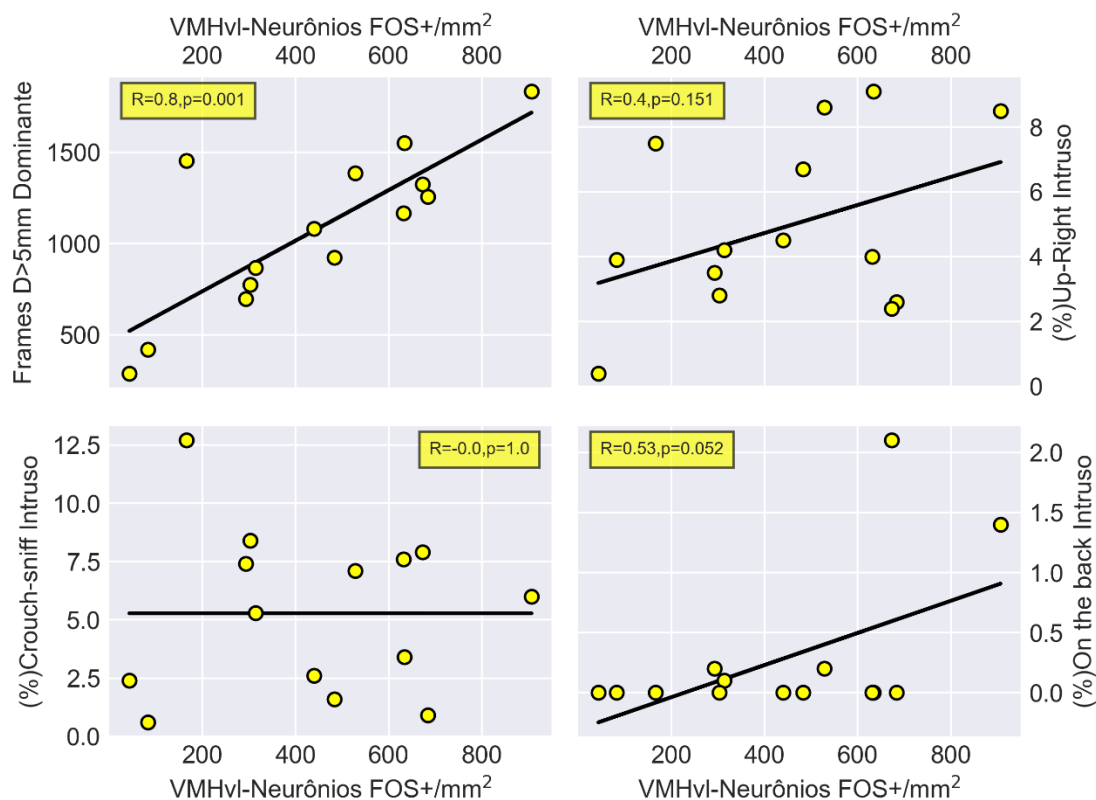


Figura 51: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior que 5mm($R=0.8$, $p=0.001$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e percentual do tempo realizado Up-right pelo intruso($R=0.4, p=0.151$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e percentual de crouch-sniff realizado pelo intruso($R=0$, $p=1$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e percentual do tempo realizando On the back pelo intruso($R=0.53, p=0.052$). [la51]

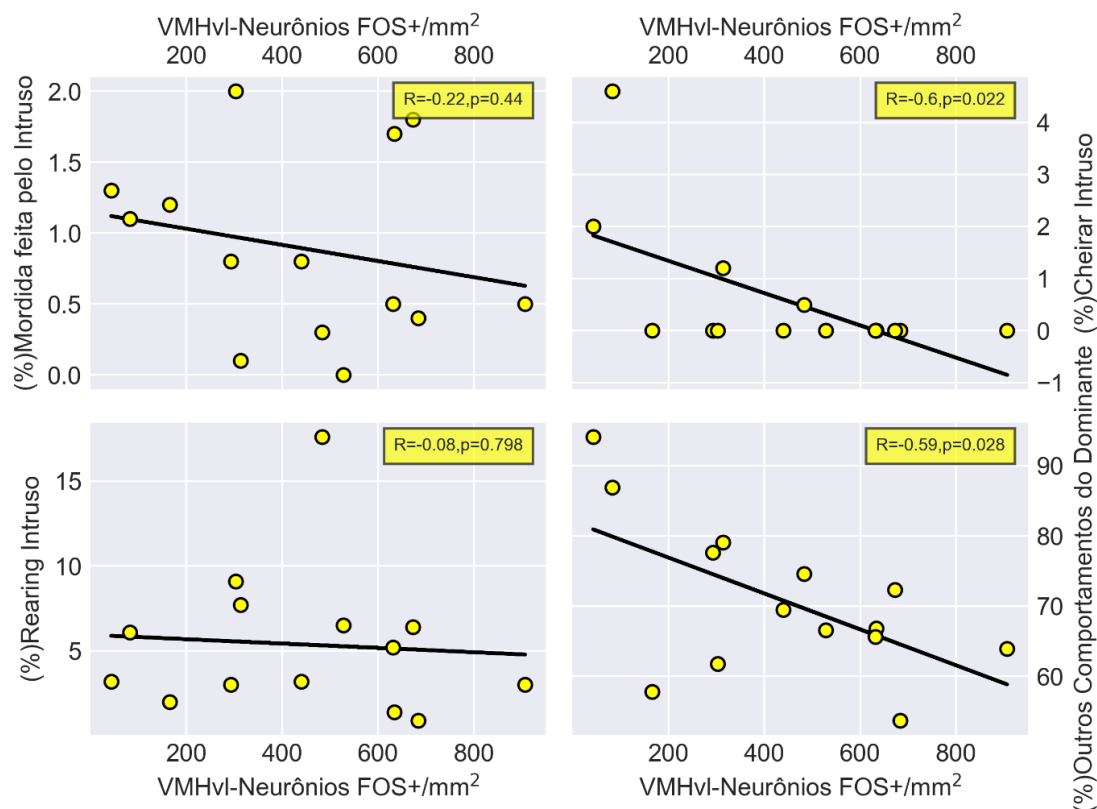


Figura 52: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e quantidade mordidas realizadas pelo intruso($R=-0.22$, $p=0.44$). Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e percentual do tempo cheirando o dominante($R=-0.6$, $p=0.022$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e percentual de rearing realizado pelo intruso($R=-0.08$, $p=0.798$). Correlação inferior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e percentual do tempo realizando outros comportamentos(não agressivos) pelo dominante($R=-0.59$, $p=0.028$). [a52]

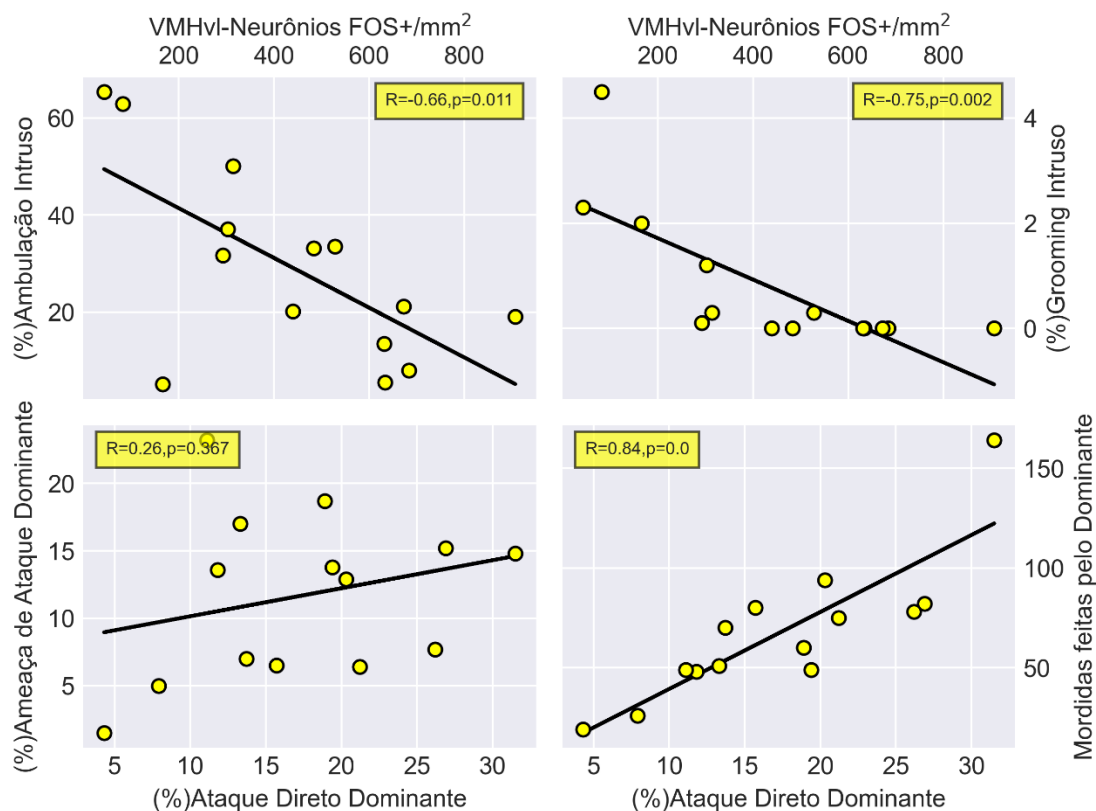


Figura 53: Correlação superior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e percentual do tempo realizado pelo intruso de ambulação ($R=-0.66$, $p=0.011$).

Correlação superior direita: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e percentual do tempo realizado Grooming pelo intruso ($R=-0.75$, $p=0.002$).

Correlação inferior esquerda: Correlação entre a concentração de neurônios c-fos positivos no VMHvl e percentual do tempo realizando ataques diretos pelo Dominante ($R=0.26$, $p=0.367$).

Correlação inferior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e quantidade de mordidas realizadas pelo dominante ($R=0.84$, $p< 0.001$). [la53]

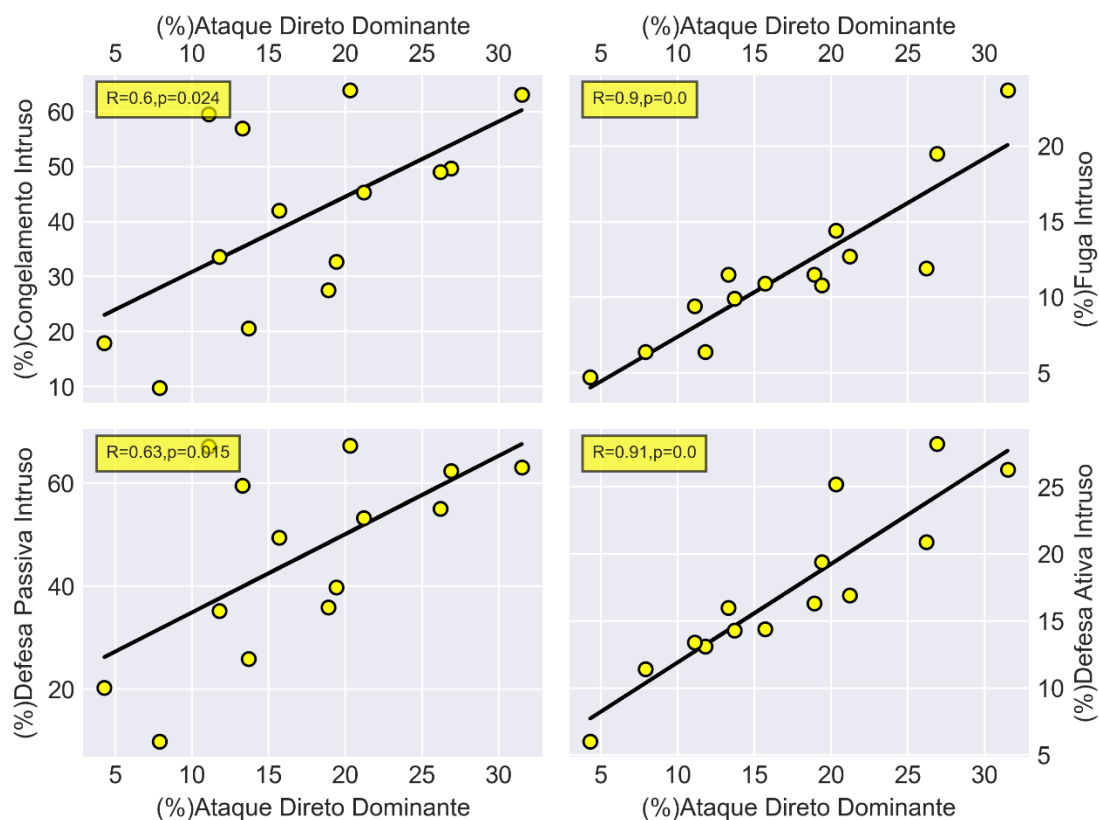


Figura 54: Correlação superior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e percentual do tempo realizando congelamento pelo intruso ($R=0.6, p=0.024$). Correlação superior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e percentual de fuga realizado intruso ($R=0.9, p < 0.001$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e percentual de defesa passiva realizada pelo intruso ($R=0.63, p=0.015$). Correlação inferior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e percentual de defesa ativa realizado intruso ($R=0.91, p < 0.001$). [a53]

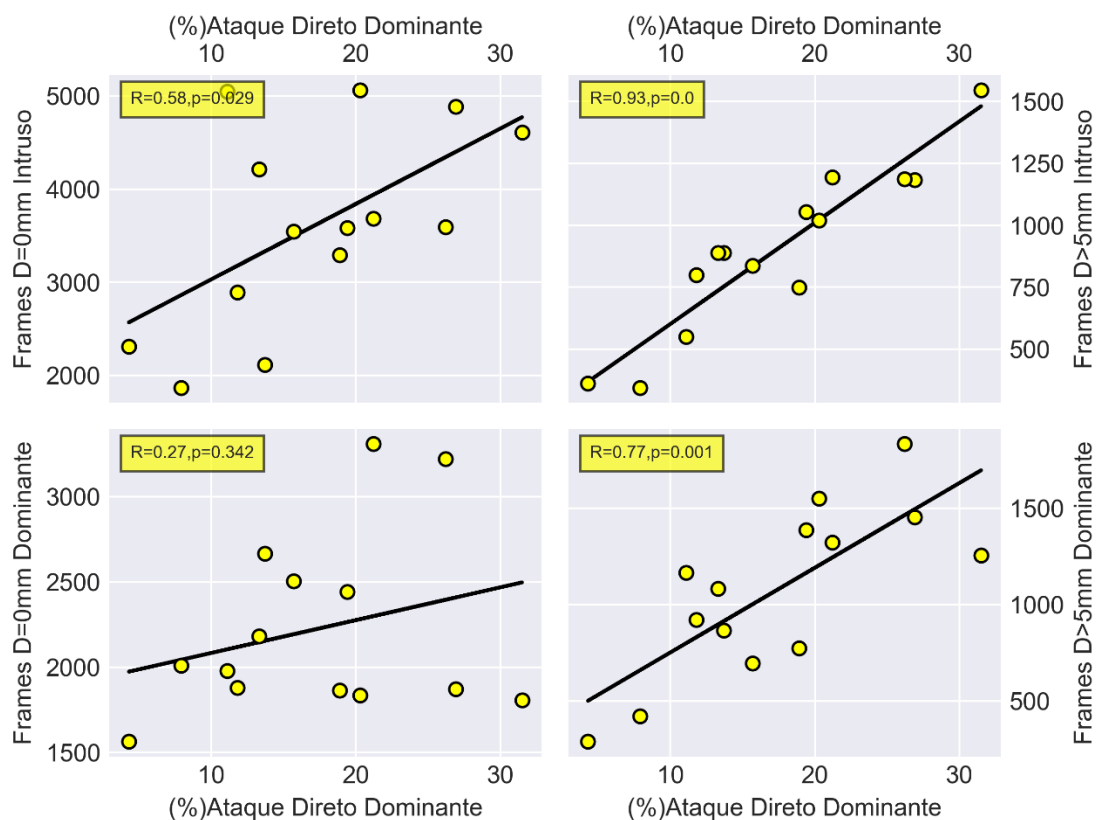


Figura 55: Correlação superior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso($R=0.58, p=0.029$).

Correlação superior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior que 5mm($R=0.93, p=0.001$).

Correlação inferior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante($R=0.27, p=0.342$).

Correlação inferior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e quantidade de frames onde houve movimentação maior que 5m do dominante($R=0.77, p=0.001$). [a54]

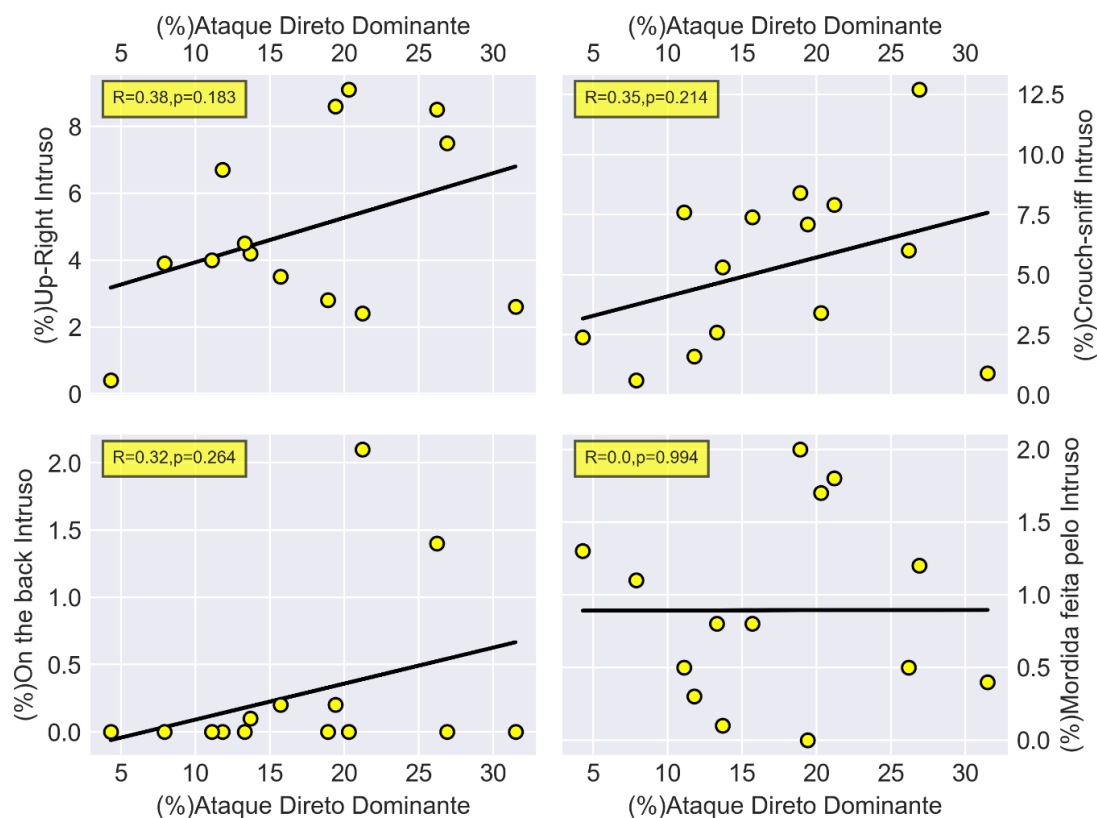


Figura 56: Correlação superior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e percentual do tempo em Up-Right do intruso ($R=0.38$, $p=0.183$). Correlação superior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e percentual do tempo em Crouch-sniff do intruso ($R=0.35$, $p=0.214$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e percentual On the back realizado pelo intruso ($R=0.32$, $p=0.264$). Correlação inferior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e quantidade de mordidas feitas pelo intruso ($R=0.0$, $p=0.994$). [la55]

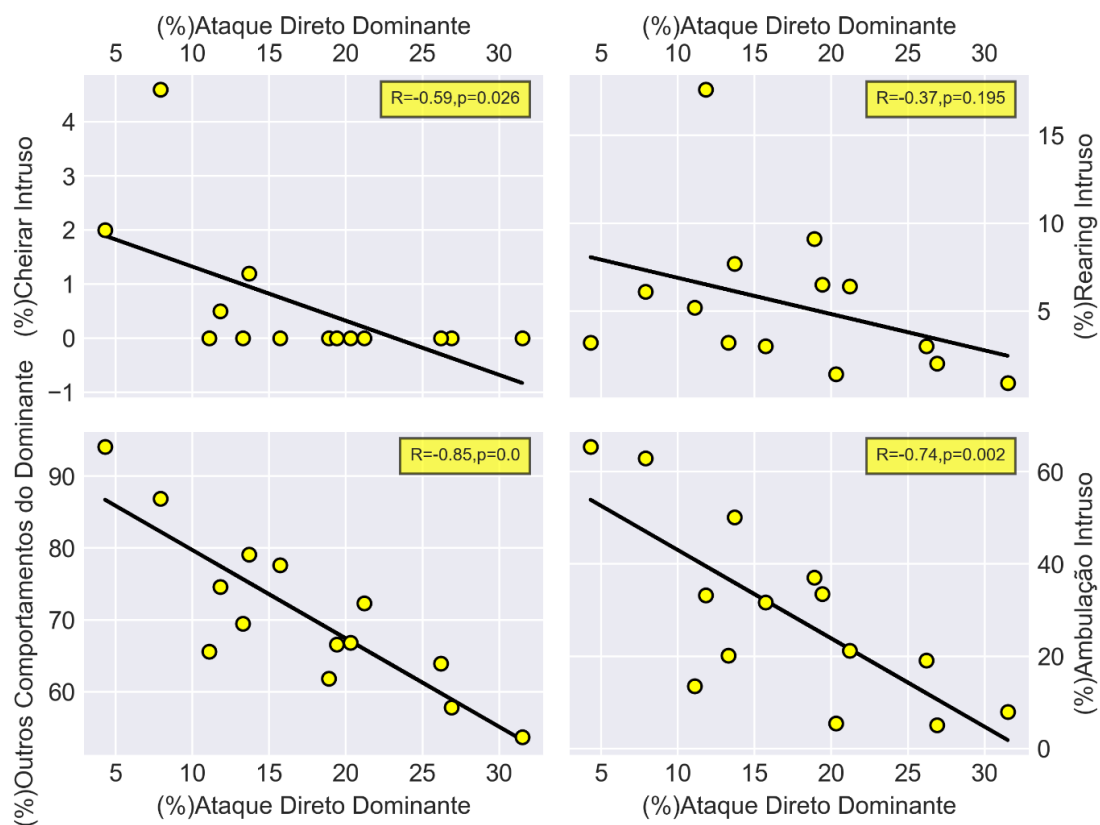


Figura 57: Correlação superior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e percentual do tempo cheirando o dominante ($R=-0.59$, $p=0.026$).

Correlação superior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e percentual do tempo em que o intruso realizou Rearing ($R=-0.37$, $p=0.195$).

Correlação inferior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e percentual do tempo em que o dominante realiza outros (não agressivos) comportamentos ($R=0.32$, $p=0.264$).

Correlação inferior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante percentual em ambulação realizado pelo intruso ($R=-0.74$, $p=0.002$). [a56]

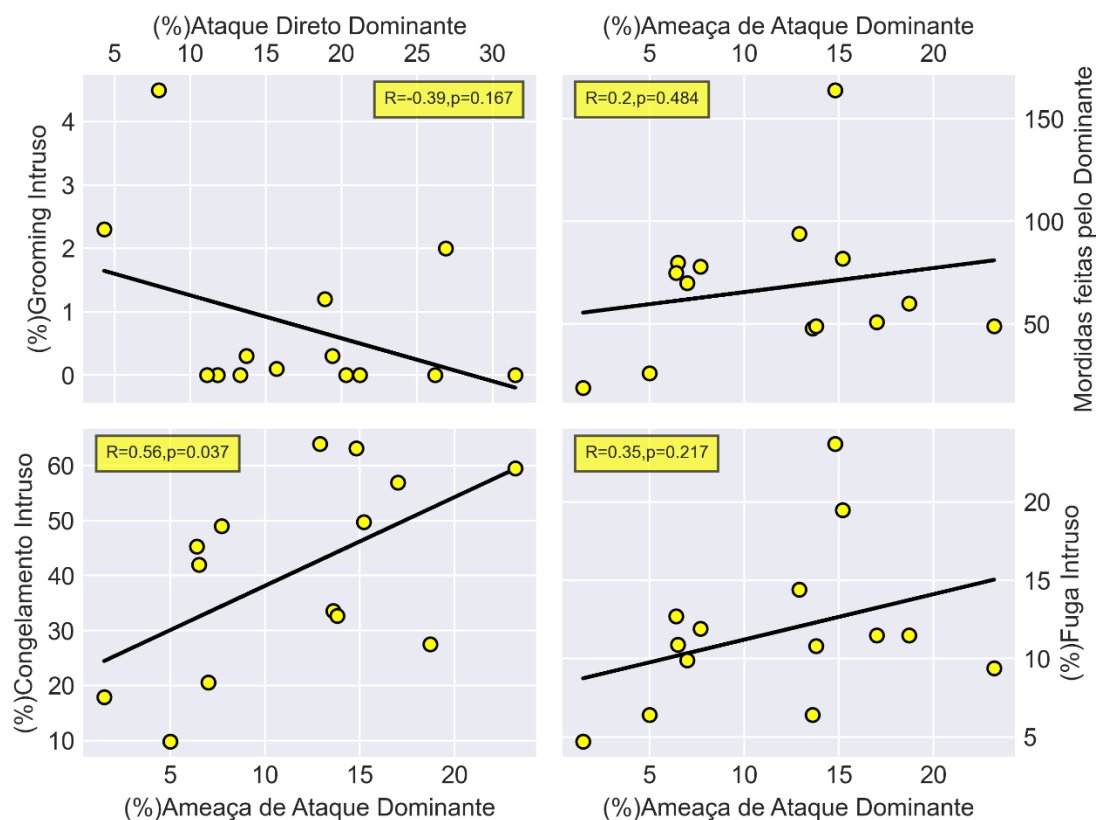


Figura 58: Correlação superior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ataques diretos pelo dominante e percentual do tempo em Grooming pelo intruso ($R=-0.39, p=0.167$).

Correlação superior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e mordidas realizadas pelo dominante ($R=0.2, p=0.484$).

Correlação inferior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e percentual do tempo em congelamento realizado pelo intruso ($R=0.56, p=0.037$).

Correlação inferior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e percentual em fuga realizado pelo Intruso ($R=0.35, p=0.217$). [la57]

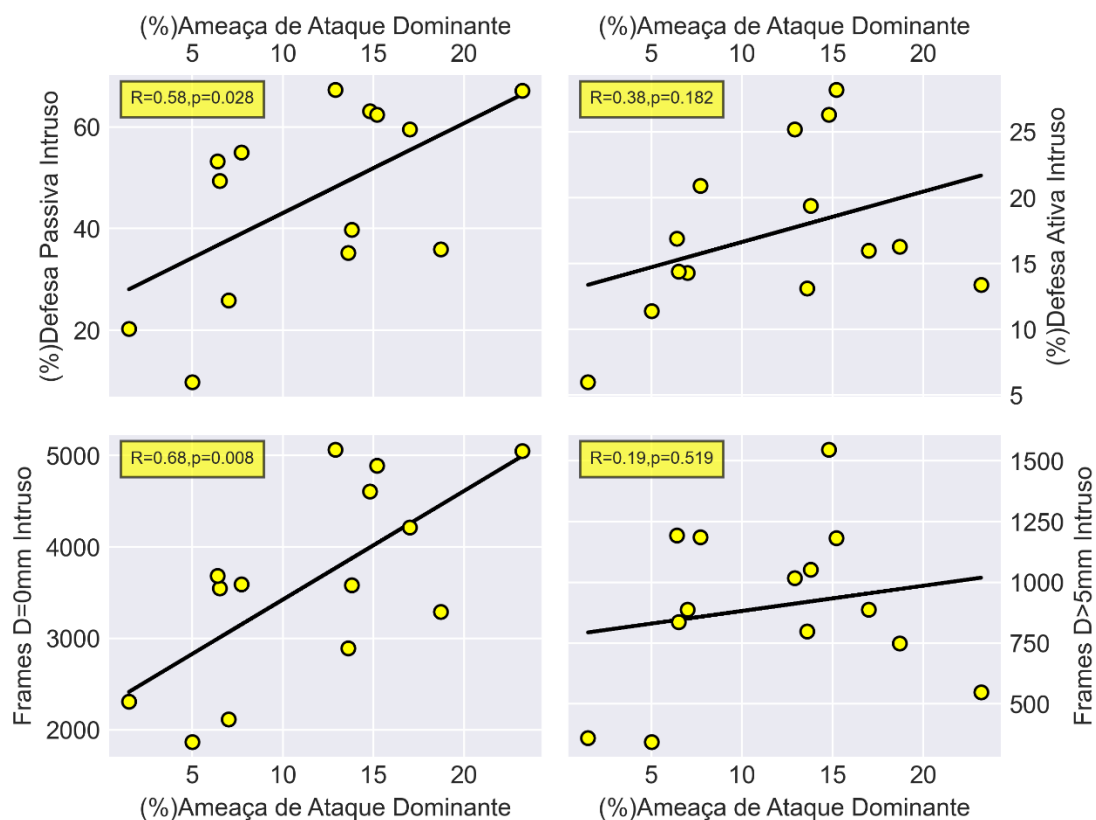


Figura 59: Correlação superior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e percentual de defesa passiva realizada pelo intruso ($R=0.58$, $p=0.028$).

Correlação superior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e percentual do tempo realizando defesa ativa pelo intruso ($R=0.38$, $p=0.182$).

Correlação inferior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso ($R=0.68$, $p=0.008$).

Correlação inferior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior do que 5mm ($R=0.19$, $p=0.519$).[\[la58\]](#)

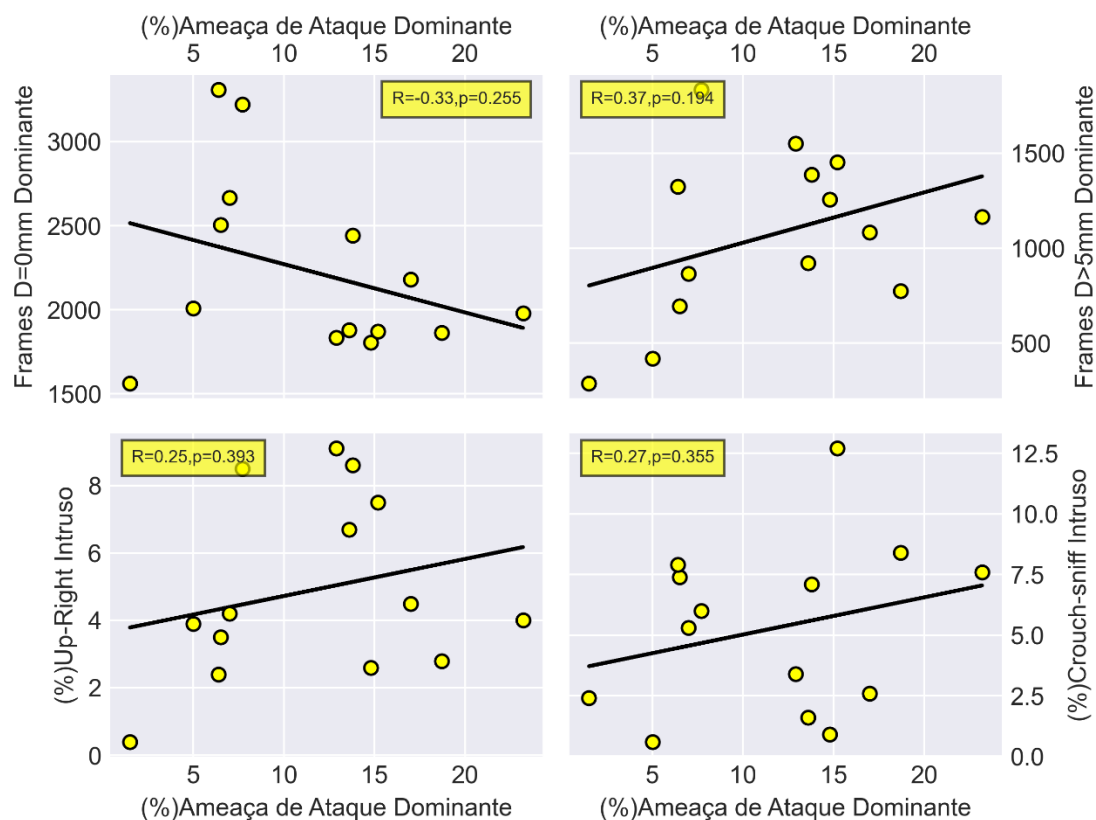


Figura 60: Correlação superior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante ($R = -0.33, p = 0.255$). Correlação superior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e quantidade de frames onde houve movimentação maior que 5 mm do dominante ($R = 0.37, p = 0.194$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e percentual de Up-right realizado pelo intruso ($R = 0.25, p = 0.393$). Correlação inferior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e percentual de Crouch-sniff realizado pelo intruso ($R = 0.27, p = 0.355$). [a59]

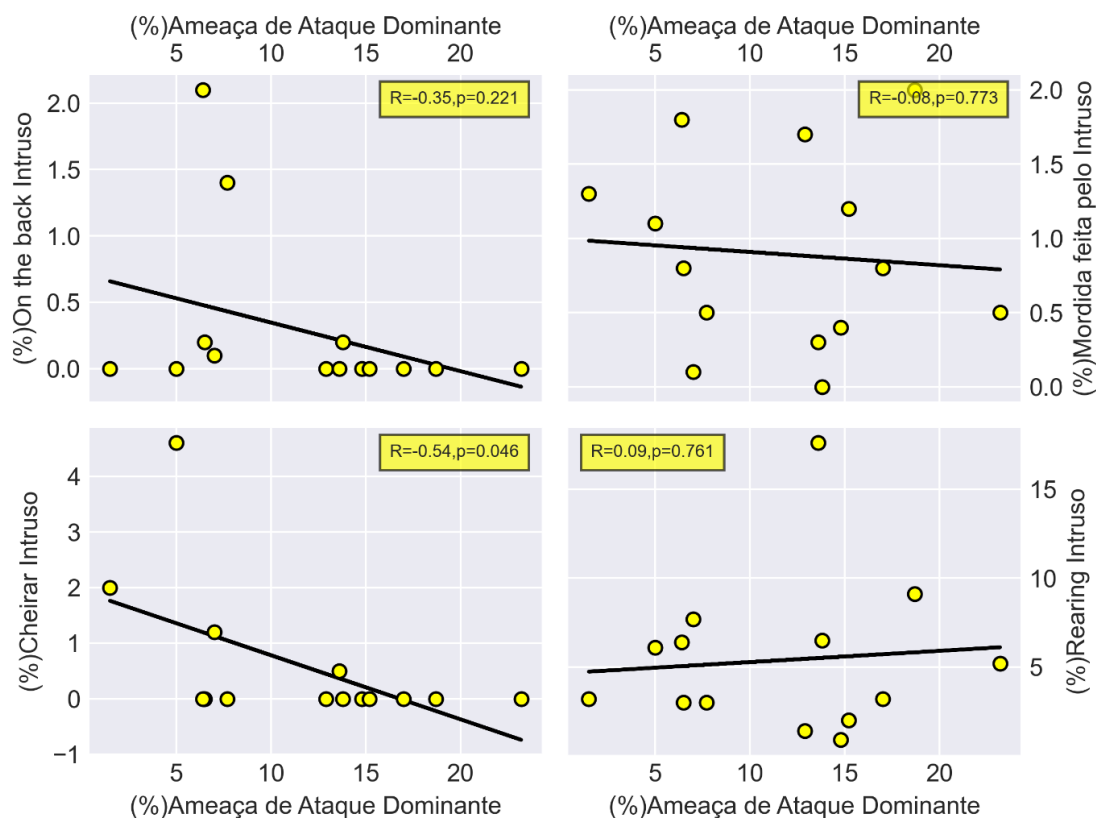


Figura 61: Correlação superior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e percentual do tempo realizando On the back pelo intruso($R=-0.35, p=0.221$). Correlação superior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e mordidas realizadas pelo intruso($R=-0.08, p=0.773$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e percentual do tempo cheirando o intruso($R=-0.54, p=0.046$). Correlação inferior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e percentual do tempo em Rearing realizado pelo intruso ($R=0.09, p=0.761$).[\[a60\]](#)

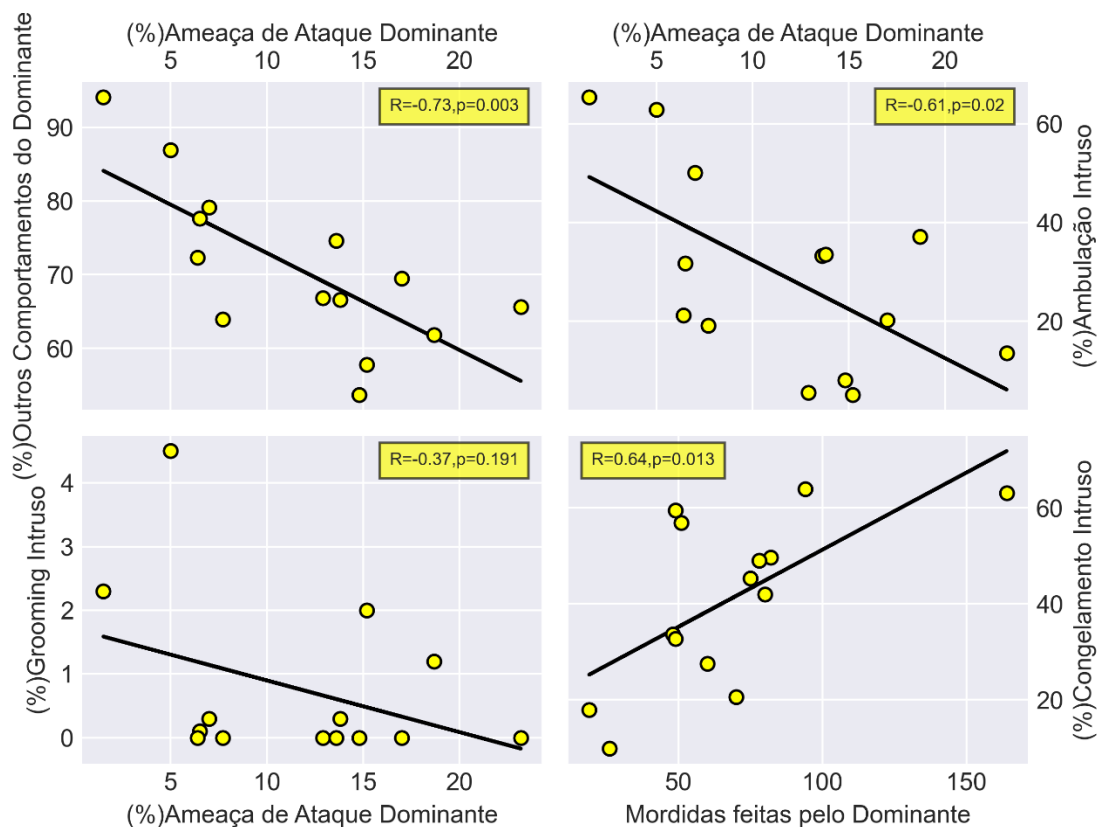


Figura 62: Correlação superior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e percentual do tempo realizando outros comportamentos (não agressivos) pelo dominante ($R=-0.73, p=0.003$). Correlação superior direita: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque e percentual do tempo em ambulação realizado pelo intruso ($R=-0.61, p=0.02$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre o percentual de tempo realizando ameaças de ataque pelo dominante e percentual do tempo realizado Grooming pelo intruso ($R=-0.37, p=0.191$). Correlação inferior direita: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e percentual do tempo em congelamento realizado pelo intruso ($R=0.64, p=0.013$). [a61]

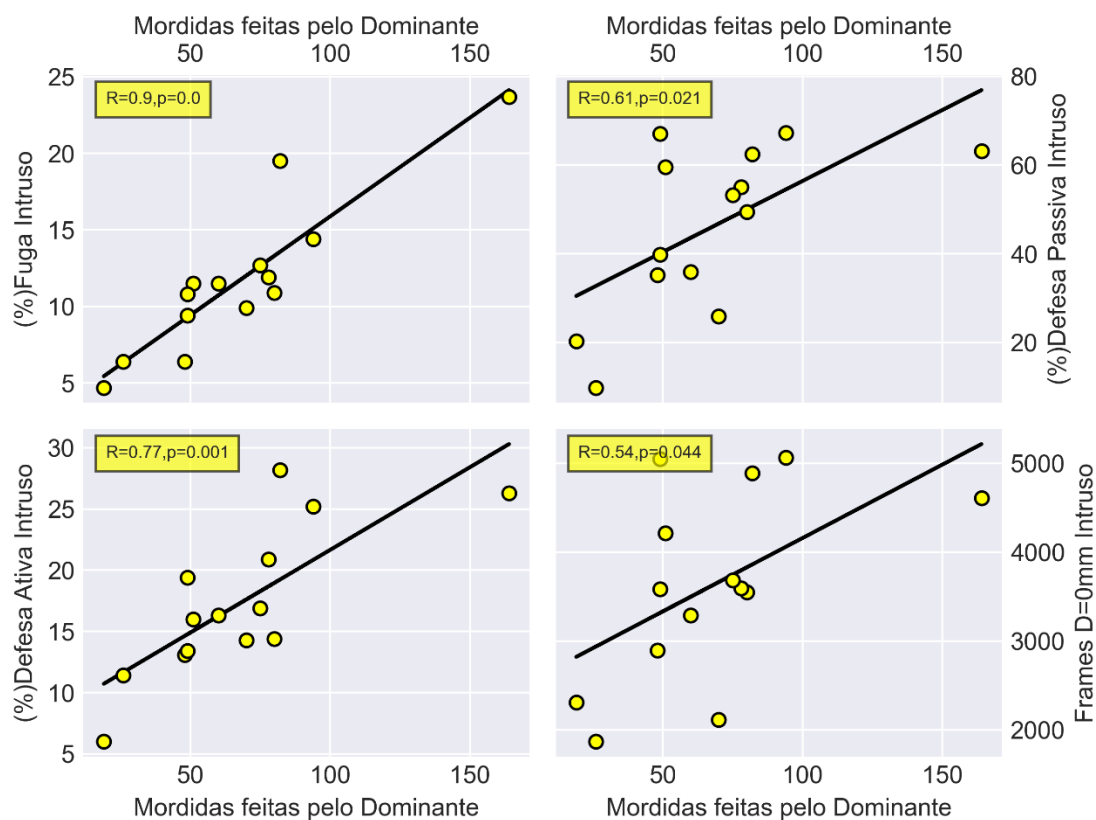


Figura 63: Correlação superior esquerda: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e percentual do tempo em fuga realizado pelo intruso ($R=0.9, p < 0.001$). Correlação superior direita: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e percentual do tempo realizado em defesa passiva pelo intruso ($R=0.61, p=0.021$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e percentual do tempo realizando defesa ativa pelo intruso ($R=0.77, p=0.001$). Correlação inferior direita: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e quantidade de frames sem movimentação realizada pelo intruso ($R=0.54, p=0.044$). [a62]

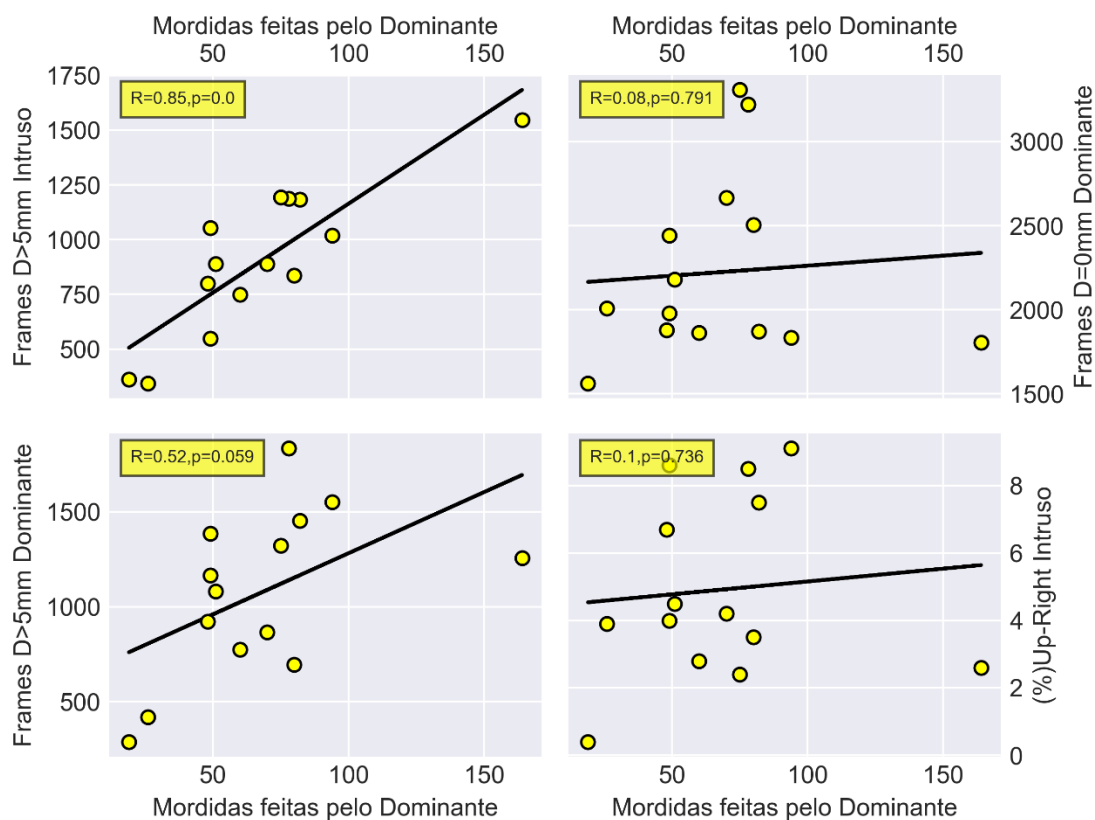


Figura 64: Correlação superior esquerda: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e quantidade de frames onde o deslocamento do intruso foi maior que 5mm ($R=0.85$, $p<0.001$). Correlação superior direita: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante ($R=0.08$, $p=0.791$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior do que 5mm ($R=0.52$, $p=0.059$). Correlação inferior direita: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e percentual do tempo realizado em up-right pelo intruso ($R=0.1$, $p=0.736$). [a63]

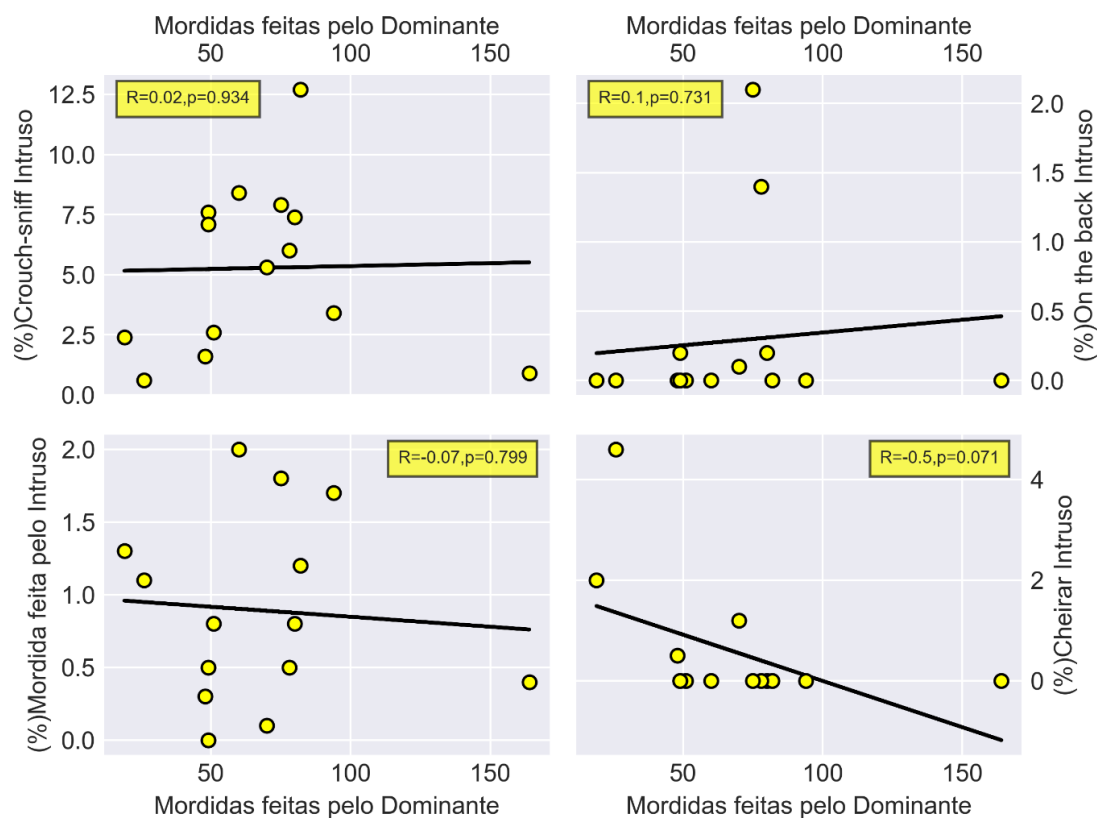


Figura 65: Correlação superior esquerda: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e percentual de Crouch-sniff realizado pelo Intruso ($R=0.02$, $p=0.934$). Correlação superior direita: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e On the back realizado pelo intruso ($R=0.1$, $p=0.731$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e percentual do tempo mordendo o dominante ($R=-0.07$, $p=0.799$). Correlação inferior direita: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e percentual do tempo cheirando o dominante ($R=-0.5$, $p=0.071$). [a64]

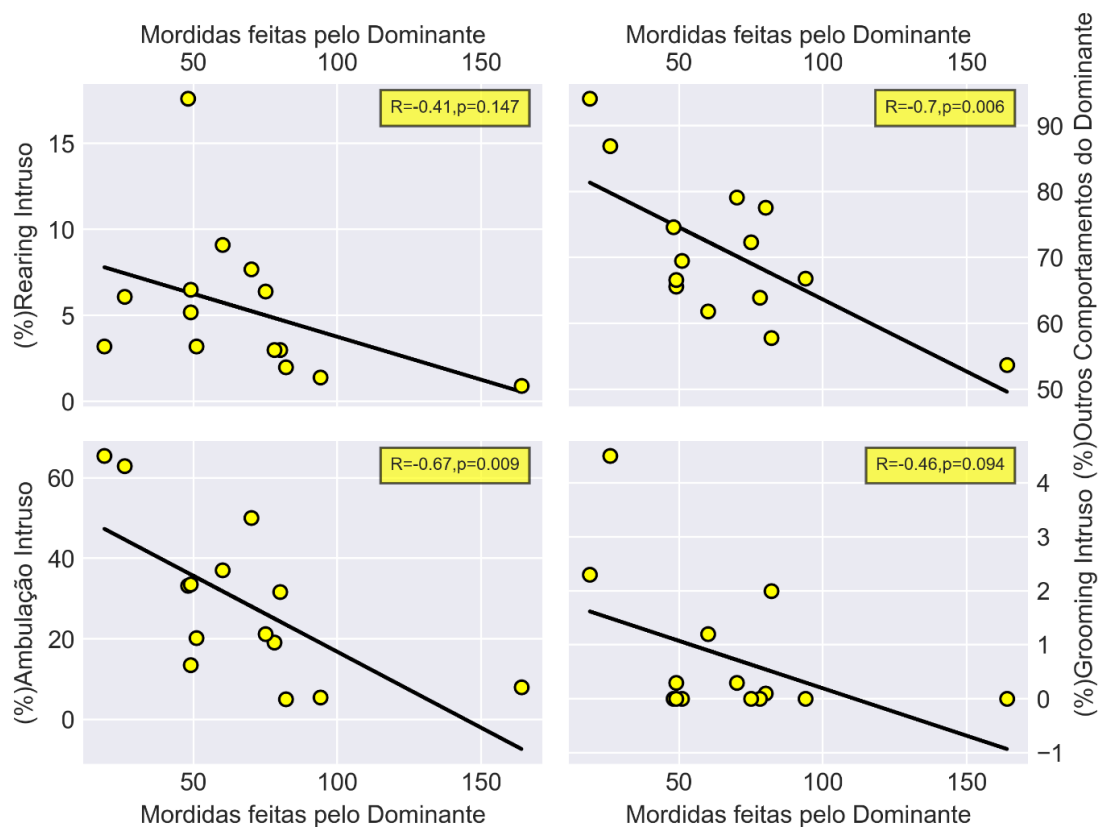


Figura 66: Correlação superior esquerda: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e percentual do tempo em Rearing realizado pelo Intruso ($R=-0.41, p=0.147$). Correlação superior direita: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e outros comportamentos (não agressivos) realizados pelo dominante ($R=-0.7, p=0.006$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e percentual do tempo em ambulação realizado pelo dominante ($R=-0.67, p=0.009$). Correlação inferior direita: Correlação entre mordidas realizadas pelo dominante e percentual do tempo em Grooming realizado pelo intruso ($R=-0.46, p=0.094$). [a65]

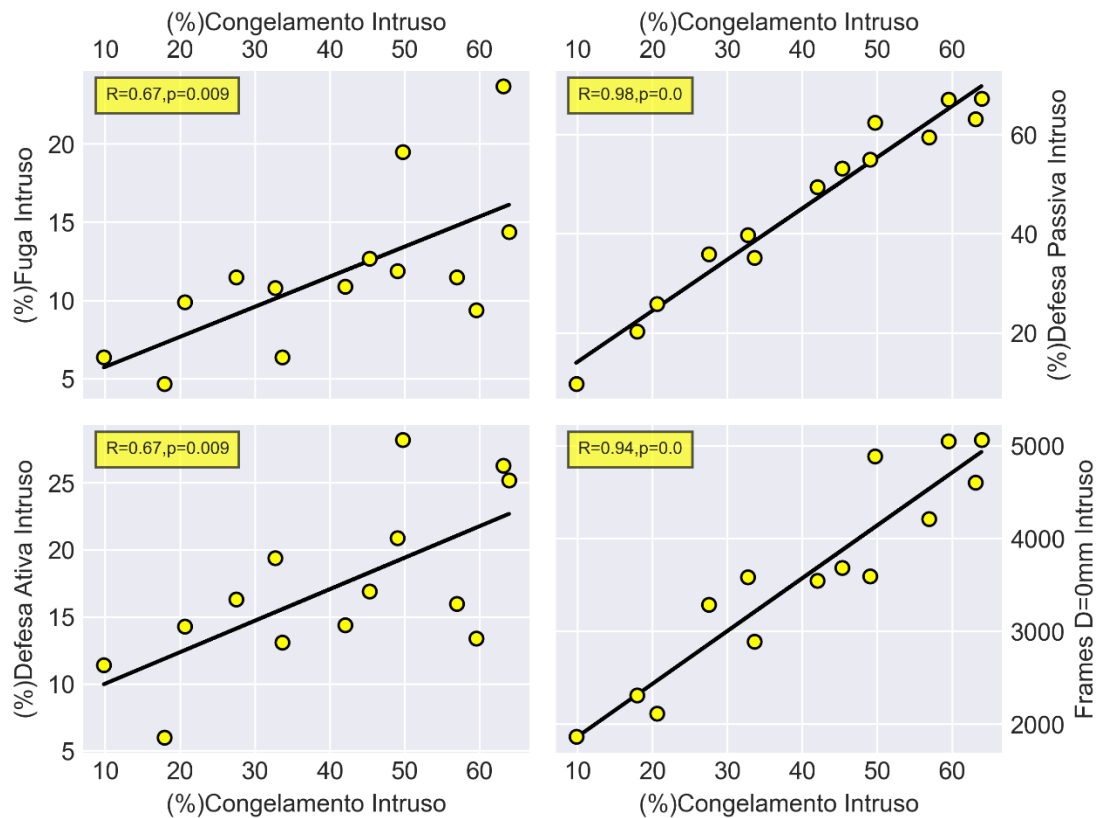


Figura 67: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso e percentual gasto em fuga ($R=0.67, p=0.009$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso e percentual gasto em defesa passiva ($R=0.98, p=< 0.001$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso e percentual gasto em defesa ativa ($R=0.67, p=0.009$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso e quantidade de frames sem movimentação do intruso ($R=0.94, p=< 0.001$). [a66]

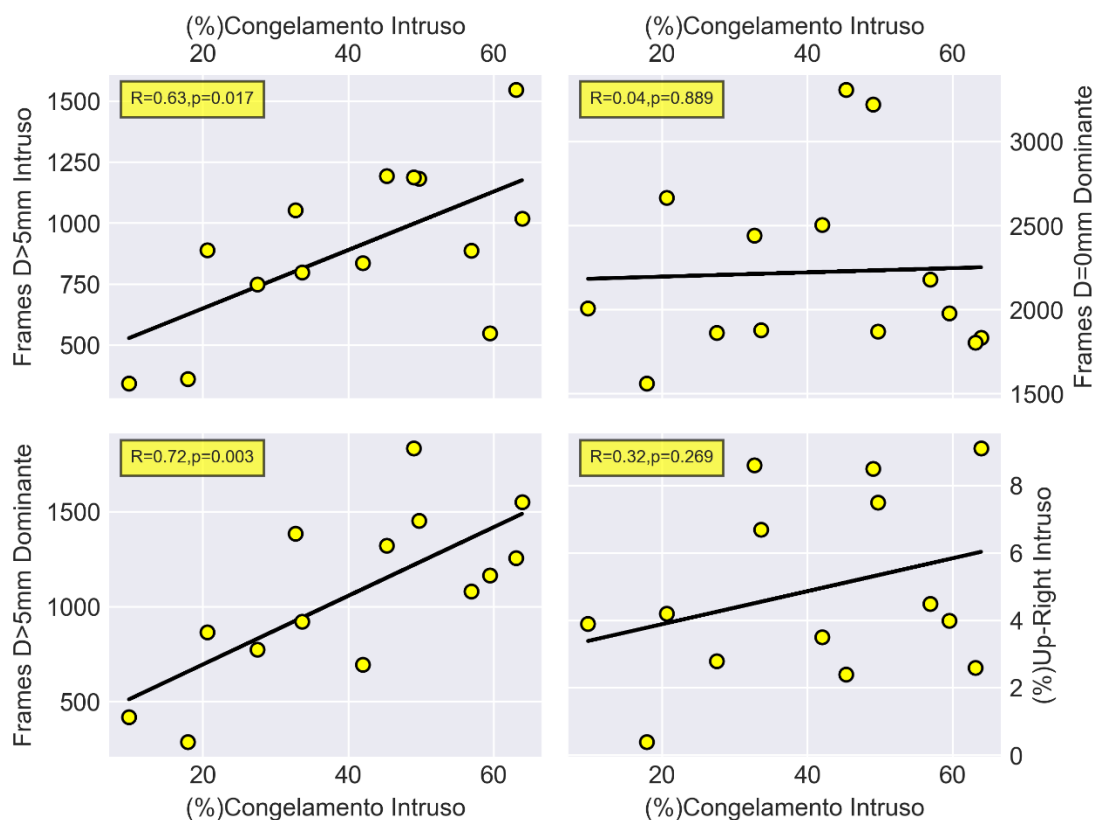


Figura 68: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso e quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior que 5mm (R=0.63, p=0.017). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso e quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante (R=0.04, p=0.889). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior que 5mm (R=0.72, p=0.003). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso e percentual do tempo gasto em Up-right (R=0.32, p=0.269). [la67]

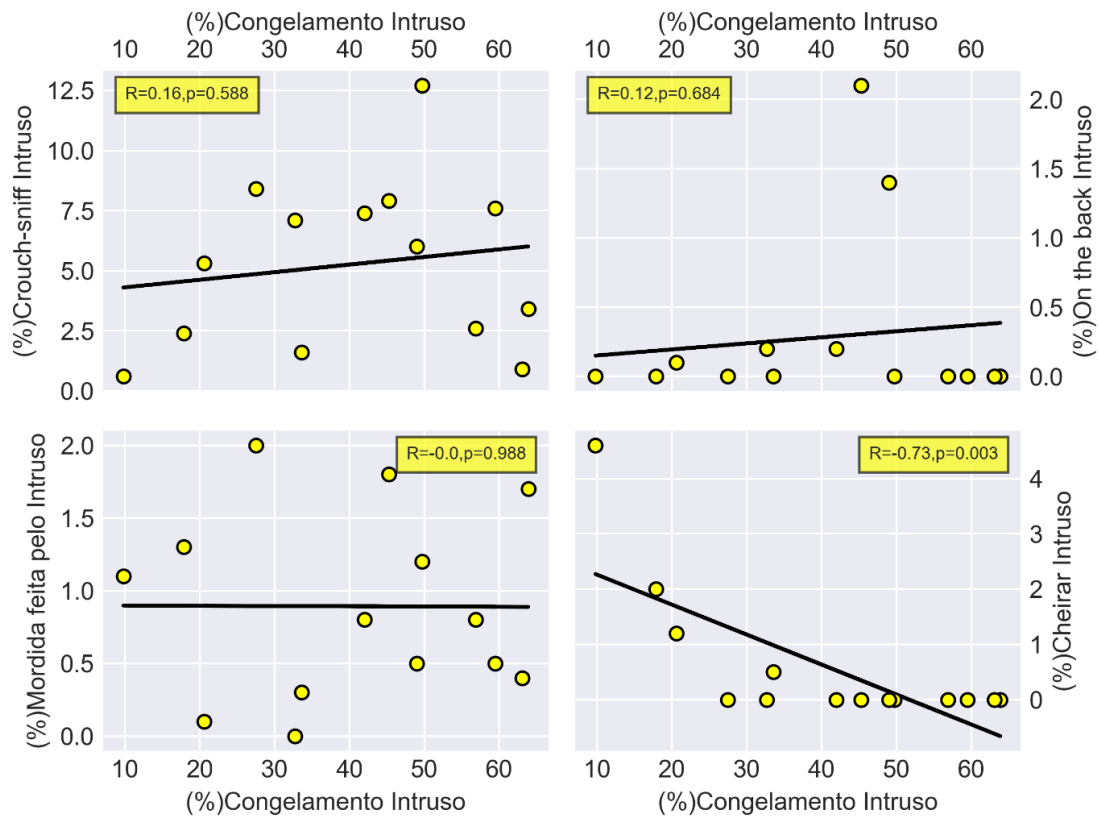


Figura 69: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso e percentual do tempo gasto em Crouch-sniff ($R=0.16, p=0.588$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso e percentual gasto em On the back ($R=0.12, p=0.684$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso e quantidade de mordidas realizadas pelo intruso ($R=0, p=0.98$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso e percentual do tempo cheirando o dominante ($R=-0.73, p=0.003$). [1a698](#)

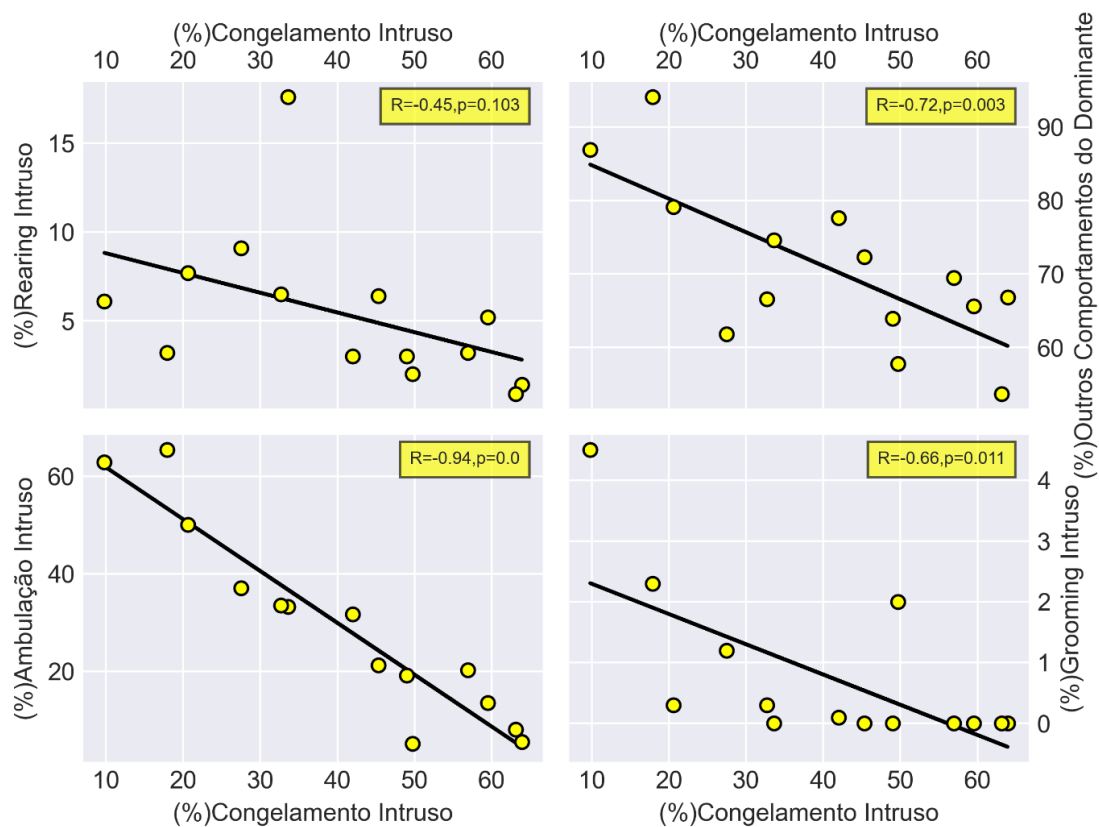


Figura 70: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso e percentual do tempo gasto em Rearing ($R=-0.45$, $p=0.103$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso e outros comportamentos (não agressivos) realizados pelo dominante ($R=-0.72$, $p=0.003$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso e percentual do tempo em ambulação realizado pelo intruso ($R=-0.934$, $p=< 0.001$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em congelamento pelo intruso e percentual do tempo gasto em Grooming ($R=-0.66$, $p=0.011$). [la69]

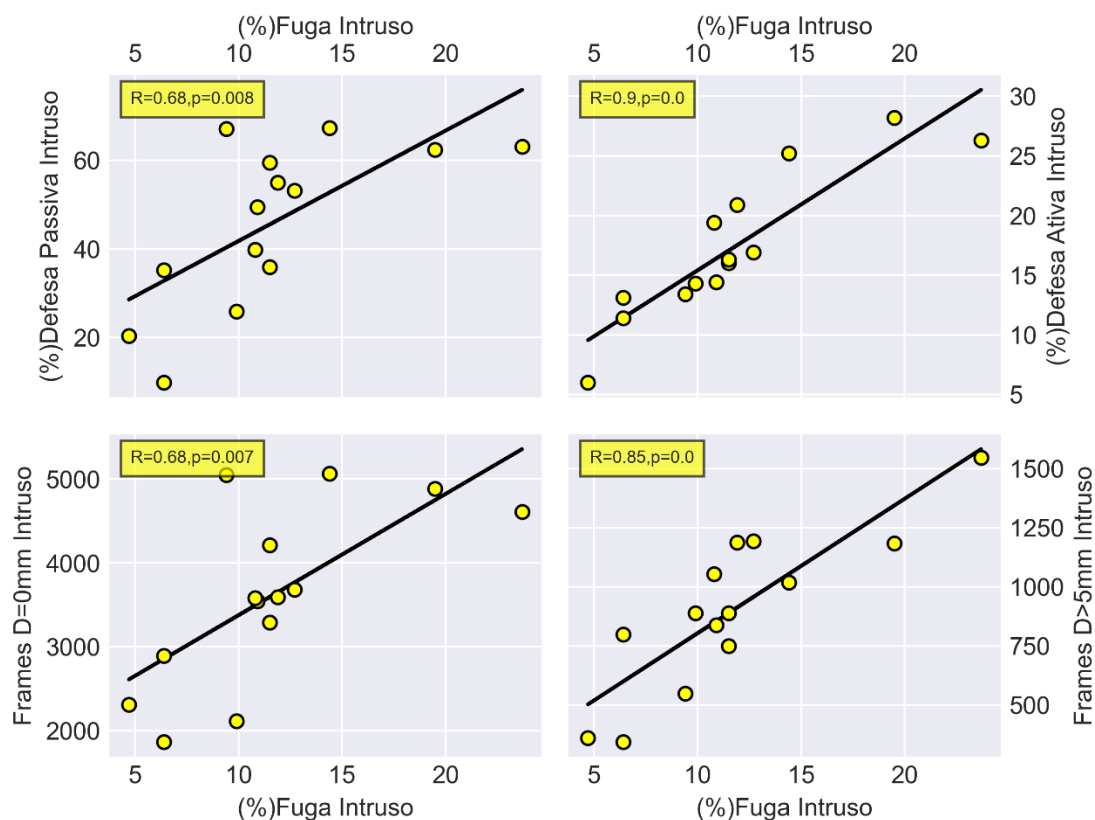


Figura 71: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em fuga pelo intruso e percentual do tempo gasto em defesa passiva ($R=0.68, p=0.008$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em fuga pelo intruso e percentual do tempo gasto em defesa ativa ($R=0.9, p< 0.001$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em fuga pelo intruso e quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso ($R=0.68, p=0.007$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em fuga pelo intruso e quantidade de frames onde houve movimentação maior que 5 mm ($R=0.85, p< 0.001$). [la70]

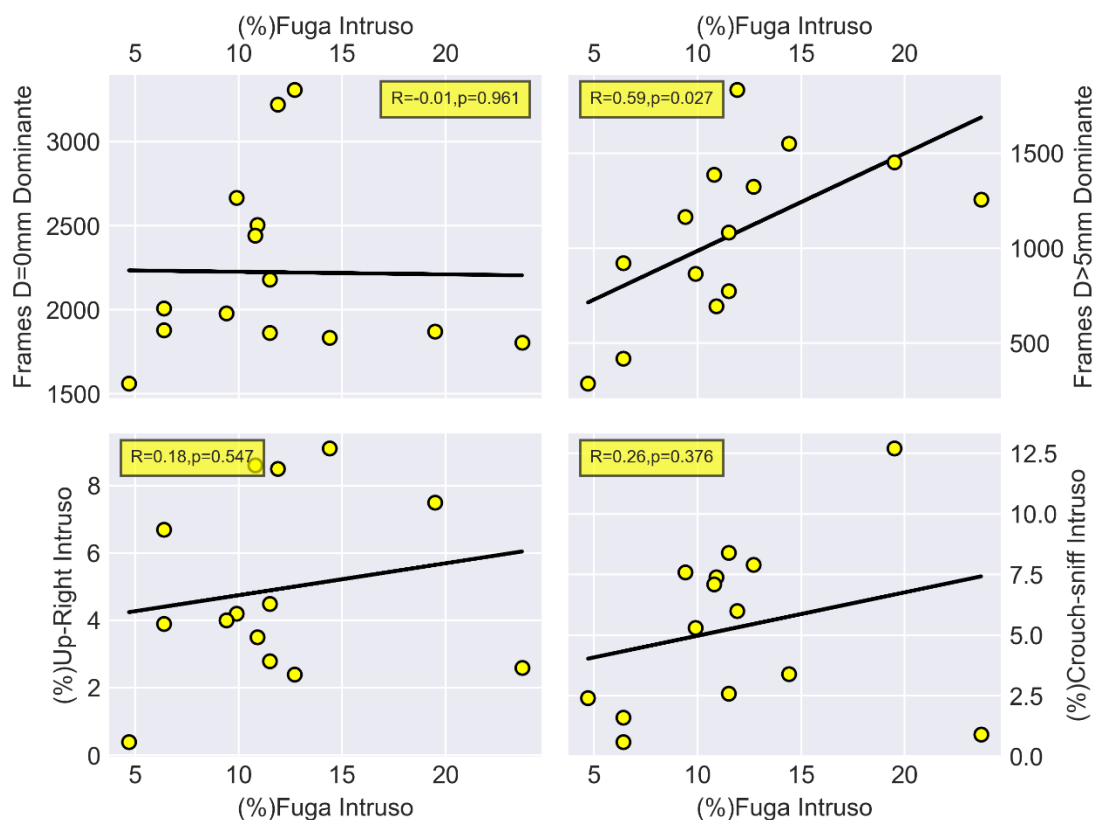


Figura 72: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em fuga pelo intruso e quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante ($R=-0.01$, $p=0.961$).

Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em fuga pelo intruso e quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior que 5mm ($R=0.59$, $p=0.027$).

Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em fuga pelo intruso e percentual do tempo gasto em Up-Right ($R=0.18$, $p=0.547$).

Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em fuga pelo intruso e percentual do tempo gasto em crouch-sniff pelo intruso ($R=0.26$, $p=0.376$). [a71]

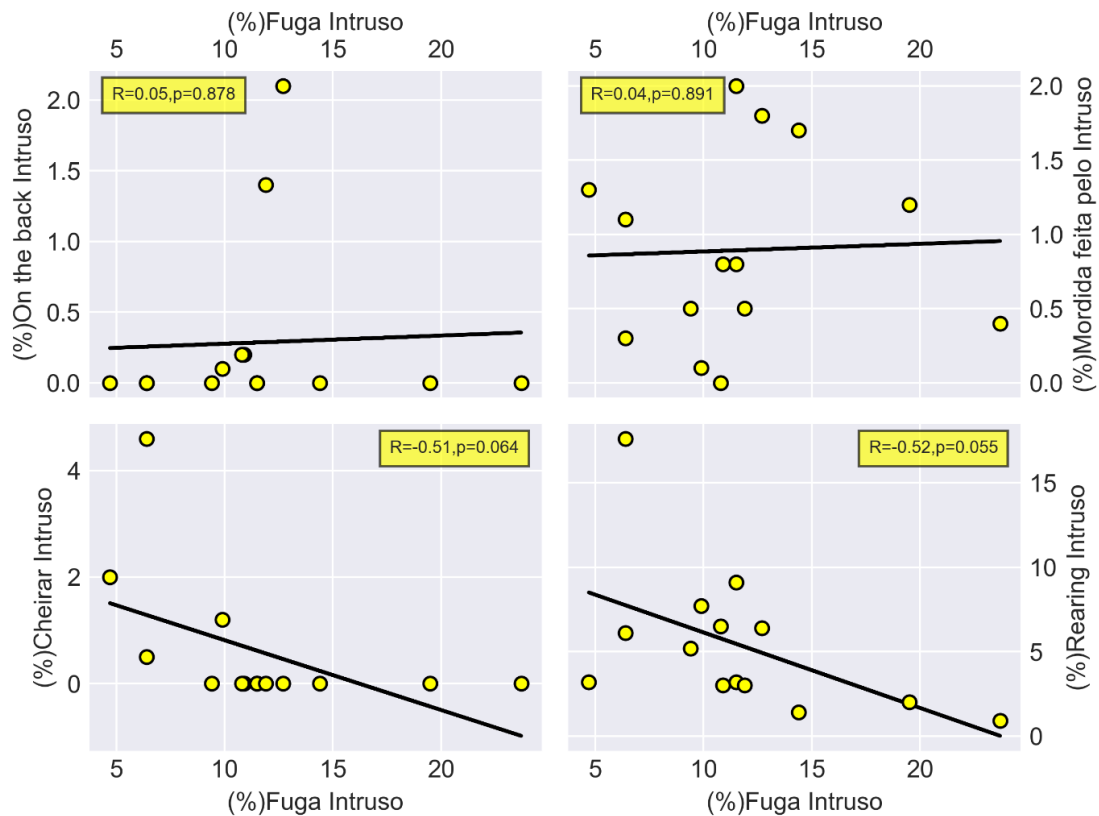


Figura 73: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em fuga pelo intruso e percentual do tempo gasto em On the back ($R=0.05$, $p=0.878$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em fuga pelo intruso e percentual do tempo gasto mordendo o dominante ($R=0.04$, $p=0.891$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em fuga pelo intruso e percentual do tempo gasto em cheirando o dominante ($R=-0.51$, $p=0.064$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em fuga pelo intruso e percentual do tempo gasto em Rearing pelo intruso ($R=-0.52, p=0.055$). [a72]

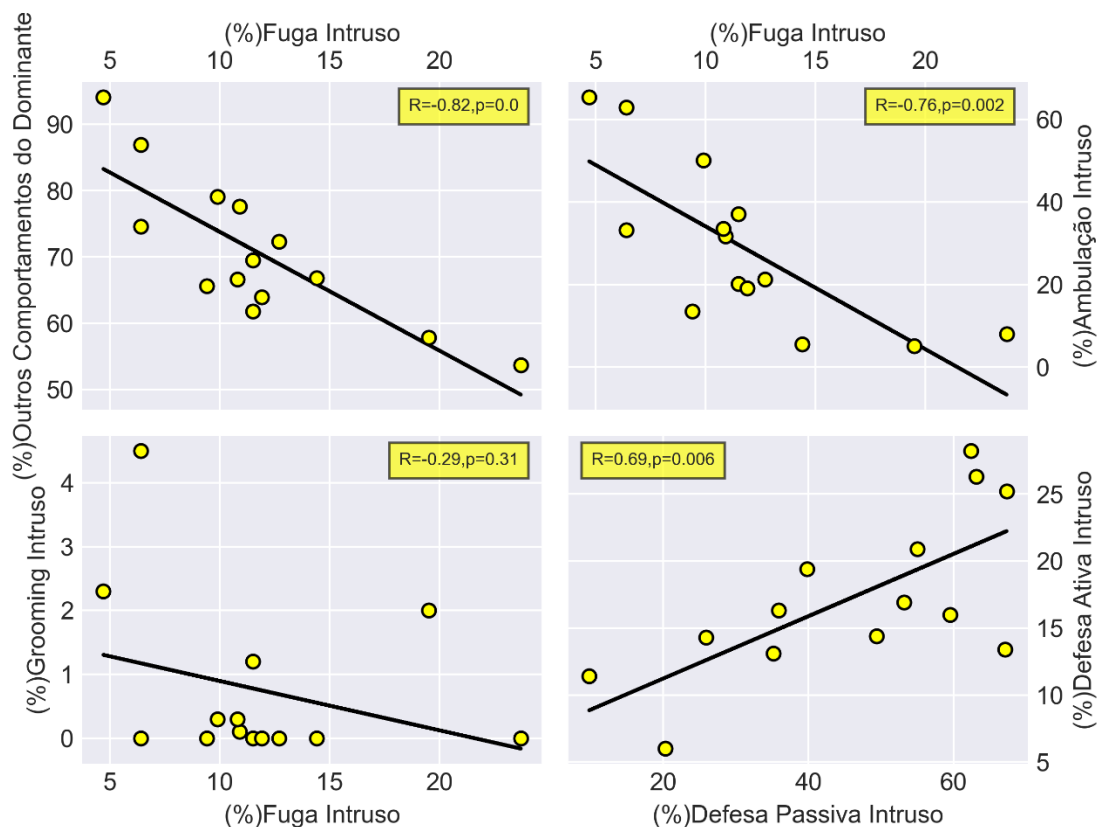


Figura 74: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em fuga pelo intruso e percentual do tempo gasto em outros comportamentos (não realizados) pelo dominante ($R=-0.82$, $p<0.001$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em fuga pelo intruso e percentual do tempo gasto em ambulação pelo intruso ($R=-0.76$, $p=0.002$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em fuga pelo intruso e percentual do tempo gasto em Grooming ($R=-0.29$, $p=0.31$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa passiva pelo intruso e percentual gasto em defesa ativa ($R=0.69, p=0.006$). [la73]

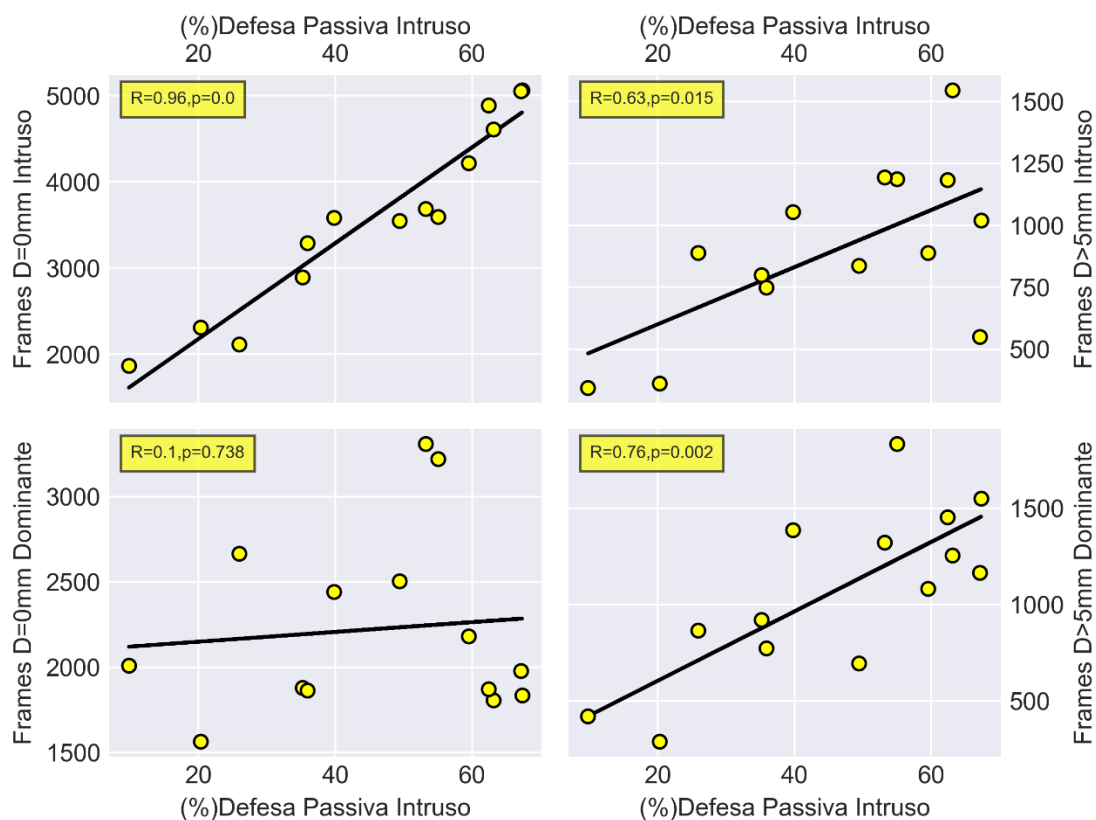


Figura 75: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa passiva pelo intruso e quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso ($R=0.96$, $p<0.001$).
 Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa passiva pelo intruso e quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior do que 5mm ($R=0.63$, $p=0.015$).
 Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa passiva pelo intruso e quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante ($R=0.1$, $p=0.738$).
 Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa passiva pelo intruso e quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior do que 5 mm ($R=0.76, p=0.002$).^[a74]

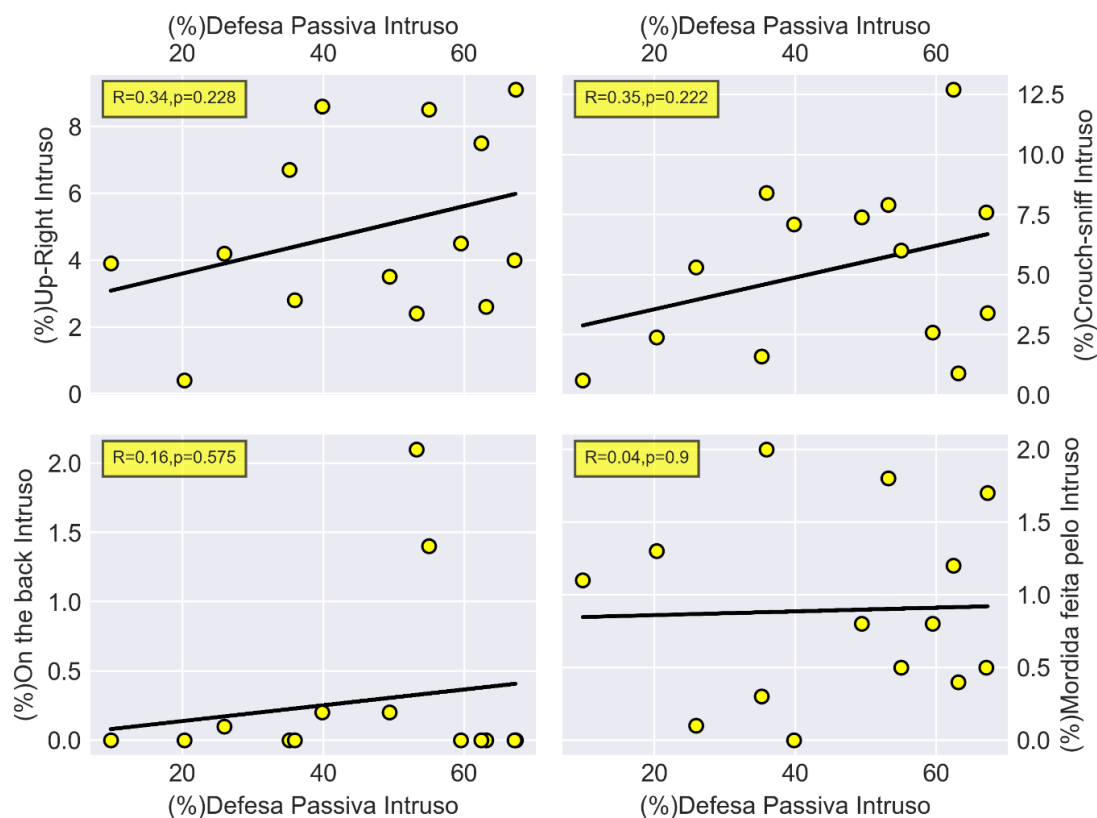


Figura 76: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa passiva pelo intruso e percentual do tempo em up-right realizado pelo intruso ($R=0.34, p=0.228$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa passiva pelo intruso e percentual do tempo em crouch-sniff realizado pelo intruso ($R=0.35, p=0.222$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa passiva pelo intruso e percentual do tempo gasto em On the back pelo intruso ($R=0.16, p=0.575$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa passiva pelo intruso e percentual do tempo mordendo o dominante ($R=0.04, p=0.9$). [la75]

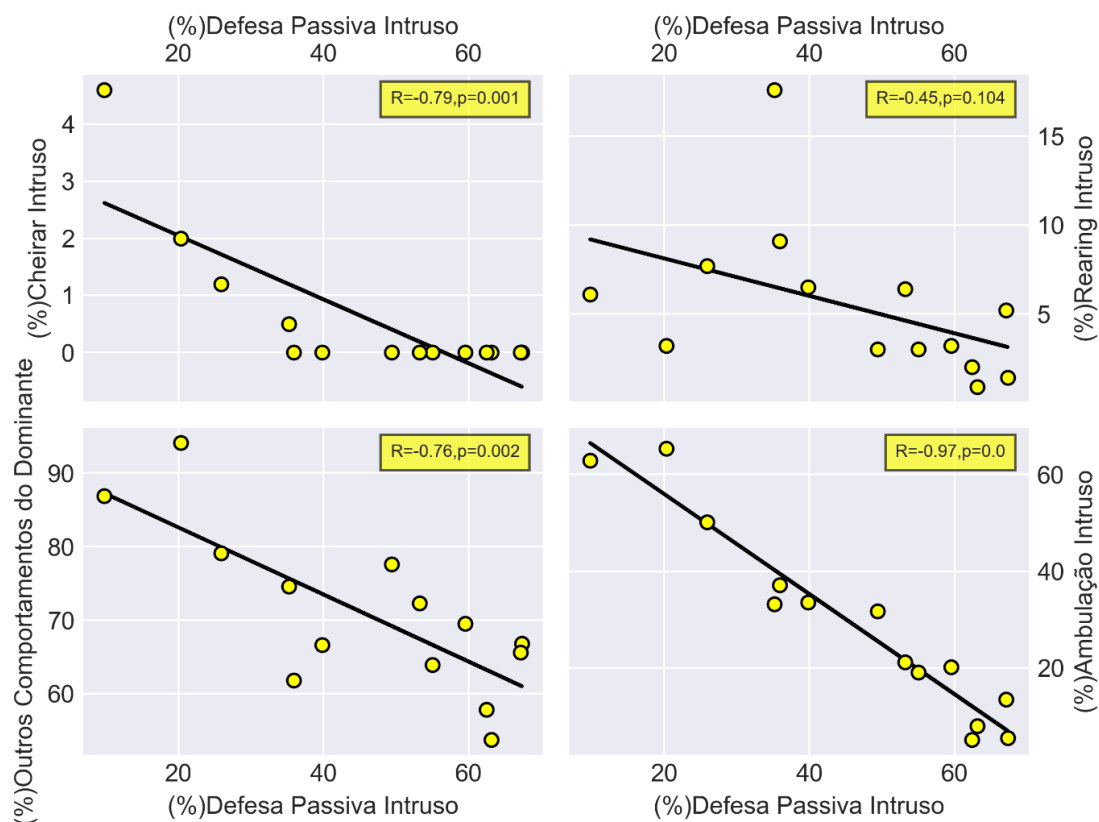


Figura 77: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa passiva pelo intruso e percentual do tempo cheirando o intruso ($R = -0.79, p = 0.001$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa passiva pelo intruso e percentual do tempo em gasto em crouch-sniff pelo intruso ($R = -0.45, p = 0.104$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa passiva pelo intruso e percentual do tempo gasto pelo dominante realizando outros comportamentos (não agressivos) ($R = -0.76, p = 0.002$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa passiva pelo intruso e percentual do tempo gasto em ambulação pelo intruso ($R = -0.97, p = < 0.001$). [la76]

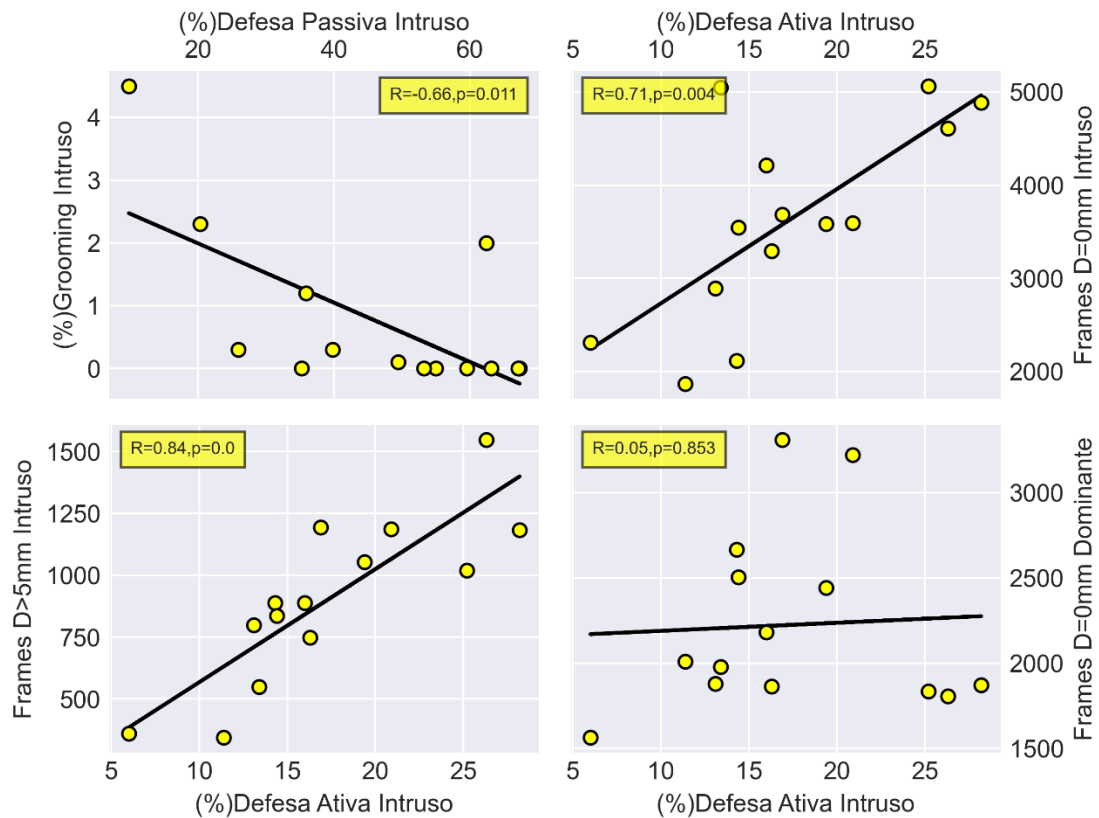


Figura 78: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa passiva pelo intruso e percentual do tempo gasto em grooming pelo intruso ($R = -0.66, p = 0.011$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa ativa pelo intruso e quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso ($R = -0.71, p = 0.004$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa ativa pelo intruso e quantidade de frames onde houve movimentação maior do que 5mm do intruso ($R = 0.84, p < 0.001$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa ativa pelo intruso e quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante ($R = 0.05, p = 0.853$). [la77]

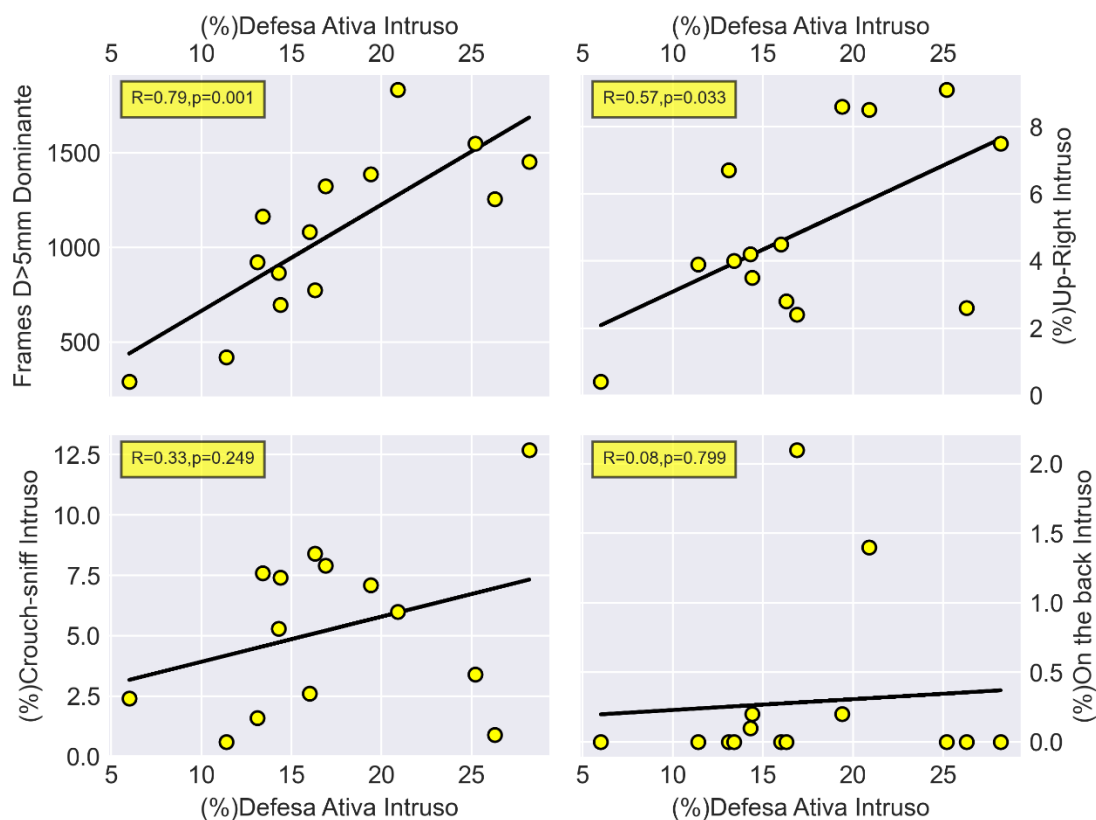


Figura 79: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa ativa pelo intruso e quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior que 5mm($R=-0.79$, $p=0.001$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa ativa pelo intruso e percentual do tempo gasto em Up-Right pelo intruso($R=0.57$, $p=0.033$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa ativa pelo intruso e percentual do tempo gasto em crouch-sniff pelo intruso($R=0.33$, $p=0.249$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa ativa pelo intruso e percentual do tempo gasto em on the back pelo intruso($R=0.08, p=0.799$). [la78]

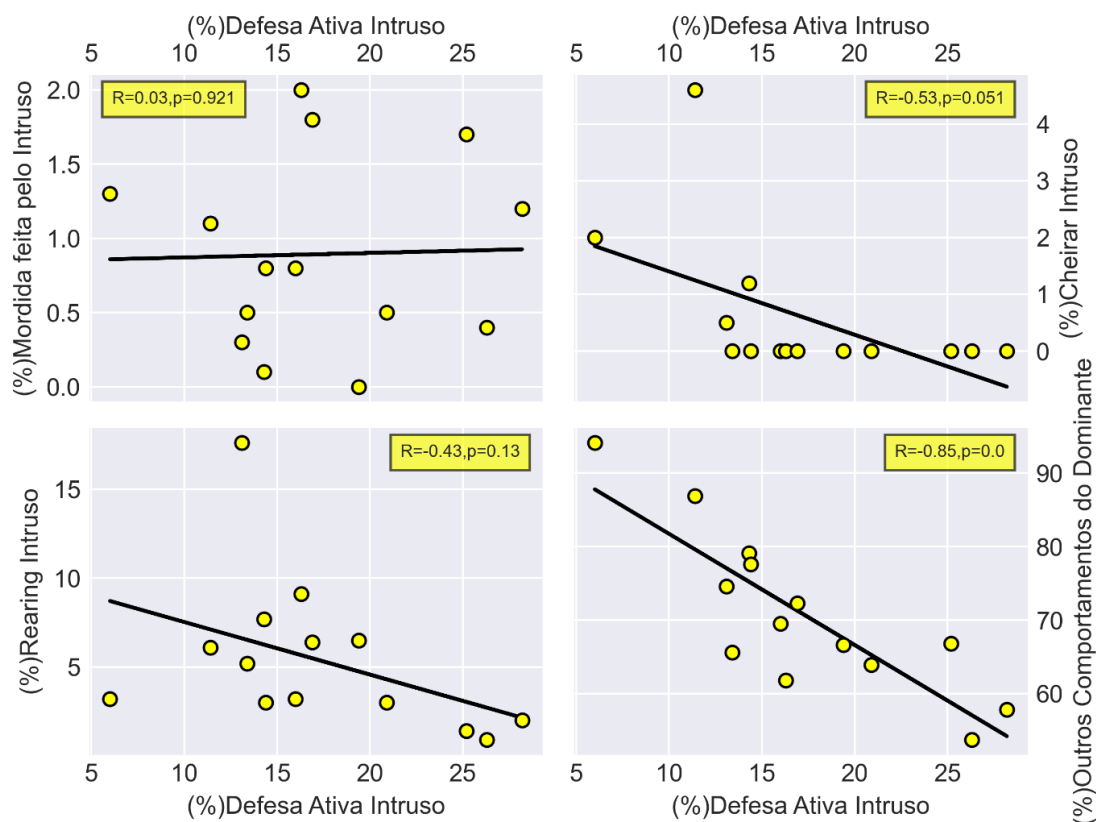


Figura 80: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa ativa pelo intruso e percentual do tempo gasto realizando mordidas pelo intruso($R=0.03, p=0.921$).

Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa ativa pelo intruso e percentual do tempo cheirando o dominante($R=-0.53, p=0.051$).

Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa ativa pelo intruso e percentual do tempo gasto em rearing pelo intruso($R=-0.43, p=0.13$).

Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa ativa pelo intruso e percentual do tempo gasto em outros comportamentos (não agressivos) pelo dominante($R=-0.85, p=< 0.001$). [a79]

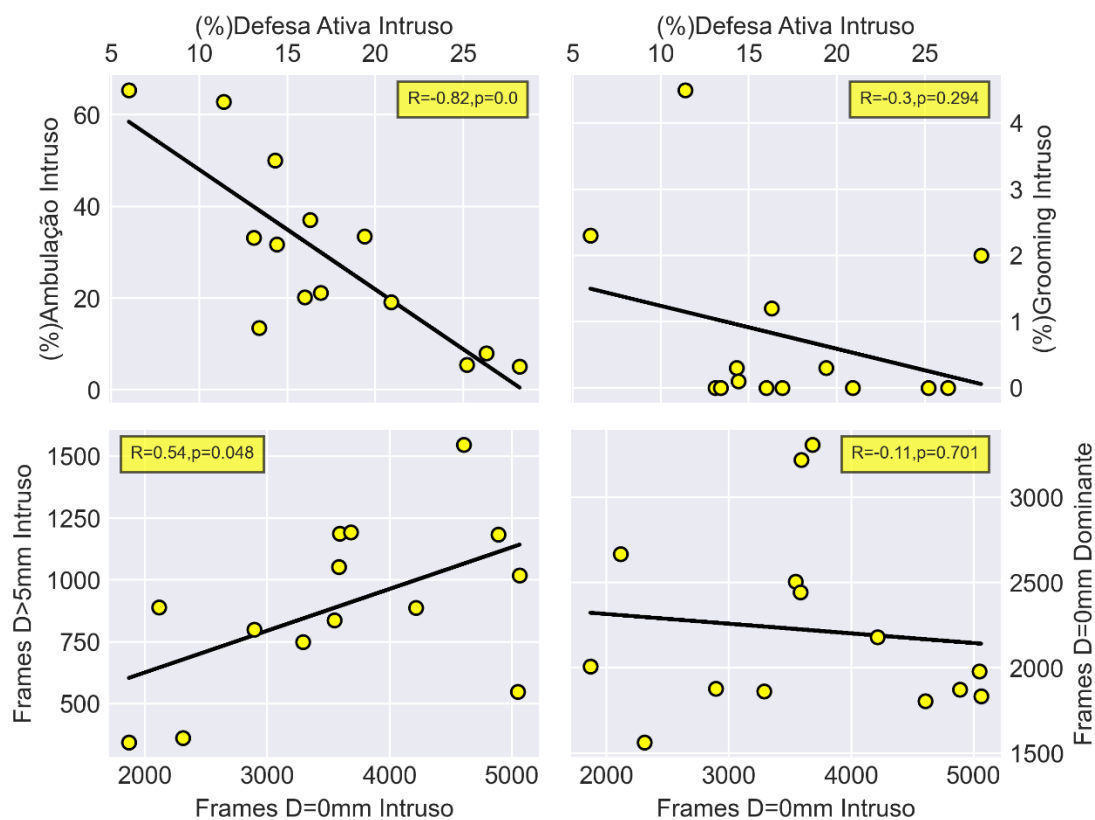


Figura 81: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa ativa pelo intruso e percentual do tempo gasto em ambulação pelo intruso ($R = -0.82$, $p < 0.001$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em defesa ativa pelo intruso e o percentual do tempo gasto em grooming pelo intruso ($R = -0.3$, $p = 0.294$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre a quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior do que 5mm e quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso ($R = 0.54$, $p = 0.048$). Correlação inferior direita: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso e quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante ($R = -0.11$, $p = 0.701$). [1a80]

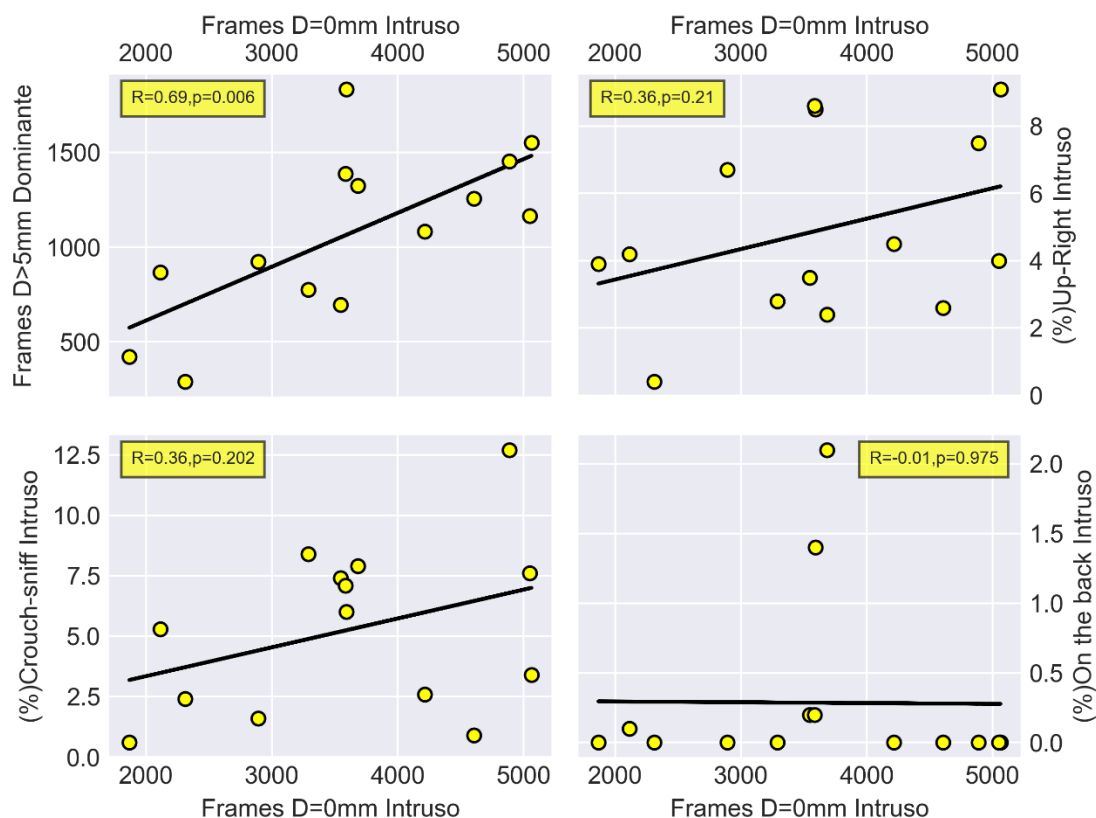


Figura 82: Correlação superior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso e quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior que 5mm($R=0.69, p=0.006$). Correlação superior direita: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso e o percentual de tempo gasto up-right pelo intruso($R=0.36, p=0.21$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso e percentual do tempo em crouch-sniff pelo intruso($R=0.36, p=0.202$). Correlação inferior direita: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso e percentual do tempo gasto em On the back pelo intruso($R=-0.01, p=0.975$).[la81]

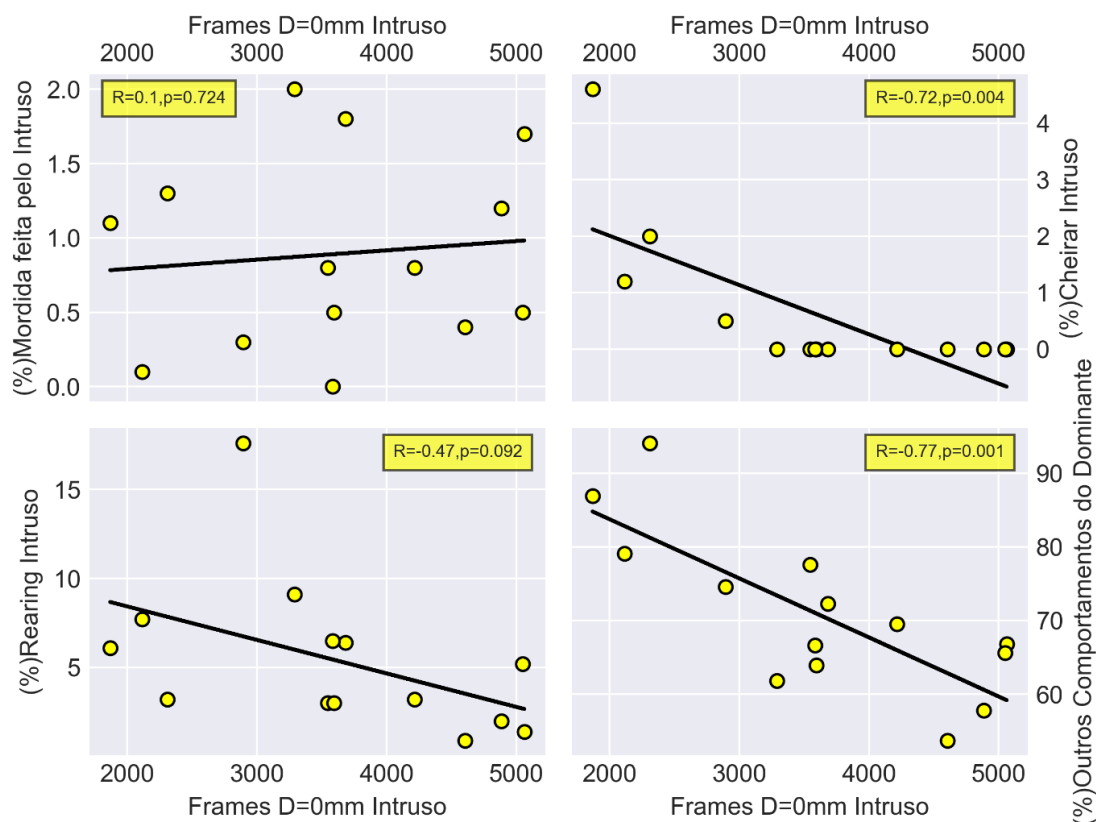


Figura 83: Correlação superior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso e percentual do tempo gasto realizando mordidas no dominante($R=0.1$, $p=0.724$). Correlação superior direita: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso e o percentual de tempo gasto cheirando o dominante ($R=-0.72$, $p=0.004$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso e percentual do tempo gasto em rearing pelo intruso($R=-0.47$, $p=0.092$). Correlação inferior direita: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso e percentual do tempo gasto em outros comportamentos (não agressivos) pelo dominante($R=-0.77$, $p=0.001$).[la82]

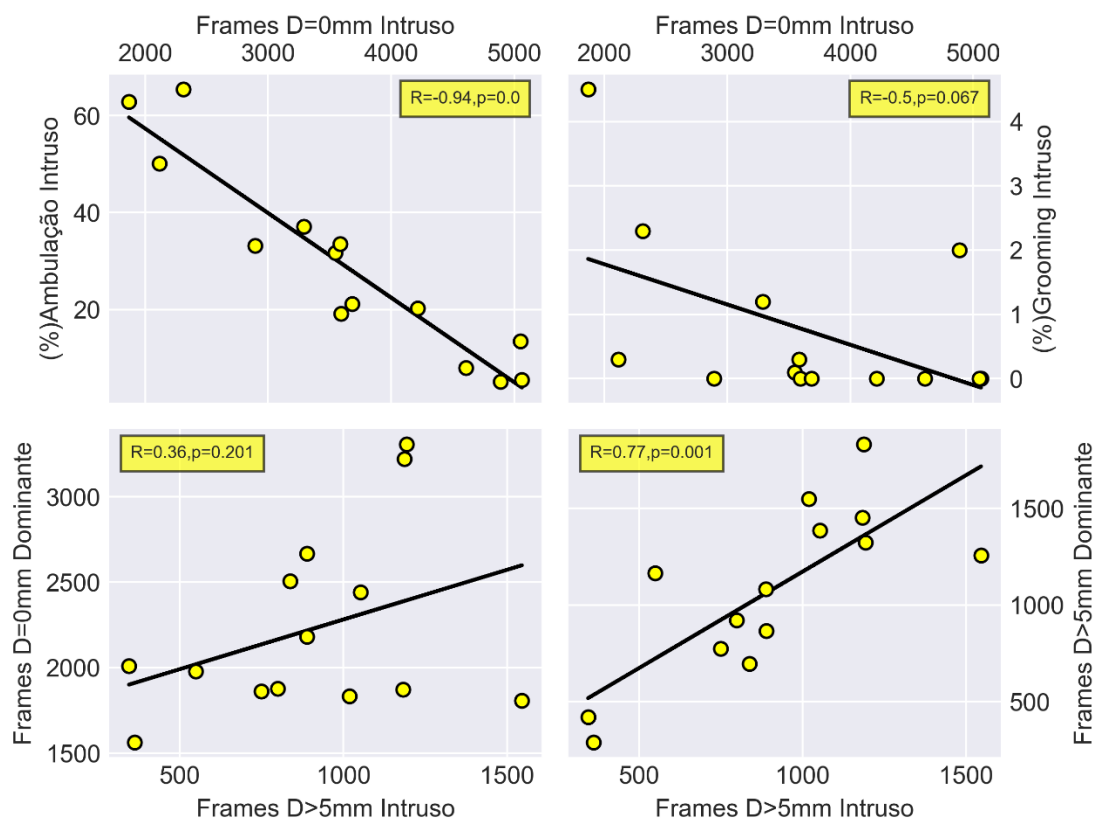


Figura 84: Correlação superior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso e o percentual do tempo gasto em ambulação pelo intruso ($R = -0.94$, $p < 0.001$). Correlação superior direita: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do intruso e o percentual de tempo gasto em grooming pelo intruso ($R = -0.5$, $p = 0.067$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde houve movimentação do intruso foi maior do que 5mm e quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante ($R = -0.36$, $p = 0.201$). Correlação inferior direita: Correlação entre quantidade de frames onde houve movimentação do intruso foi maior do que 5mm e quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior do que 5mm ($R = 0.77$, $p = 0.001$). [a83]

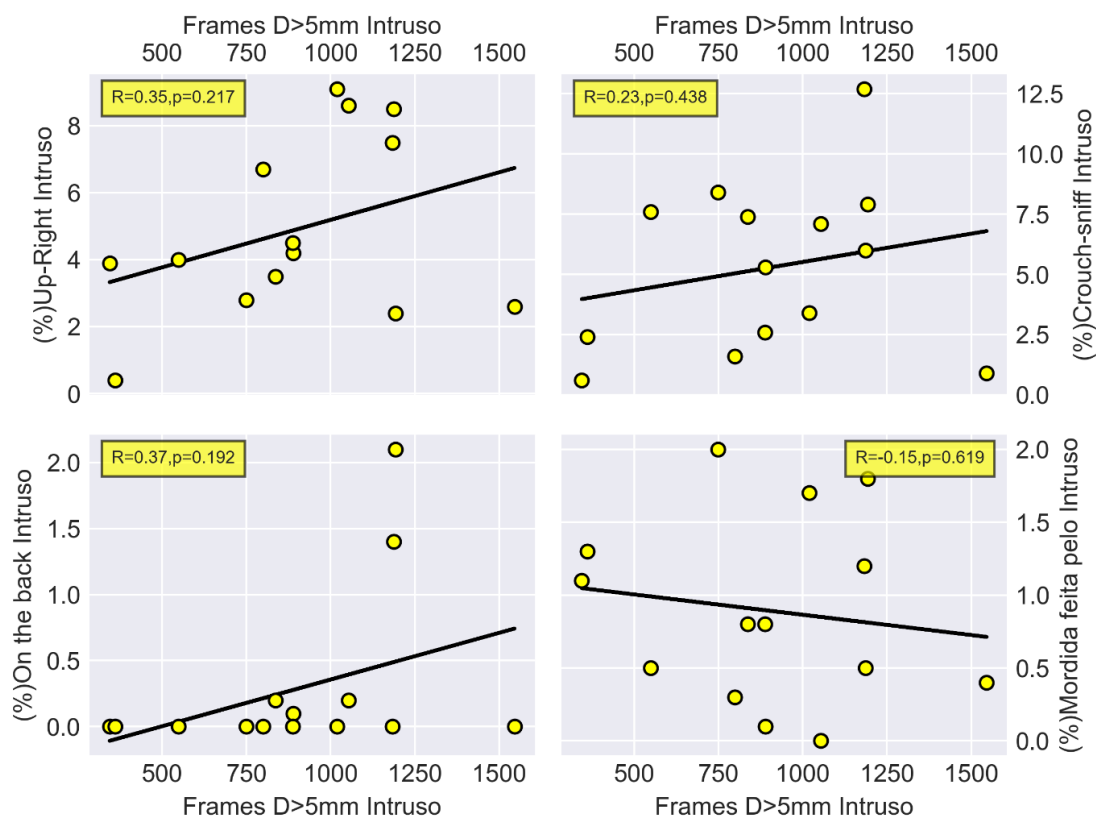


Figura 85: Correlação superior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior do que 5mm e o percentual do tempo gasto em Up-right pelo intruso ($R=0.35, p=0.217$).

Correlação superior direita: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior do que 5mm e o percentual do tempo gasto em crouch-sniff pelo intruso ($R=0.23, p=0.438$).

Correlação inferior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior do que 5mm e percentual do tempo gasto em on the back pelo intruso ($R=0.37, p=0.192$).

Correlação inferior direita: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior do que 5mm e percentual do tempo gasto mordendo o dominante ($R=-0.15, p=0.619$).^[la84]

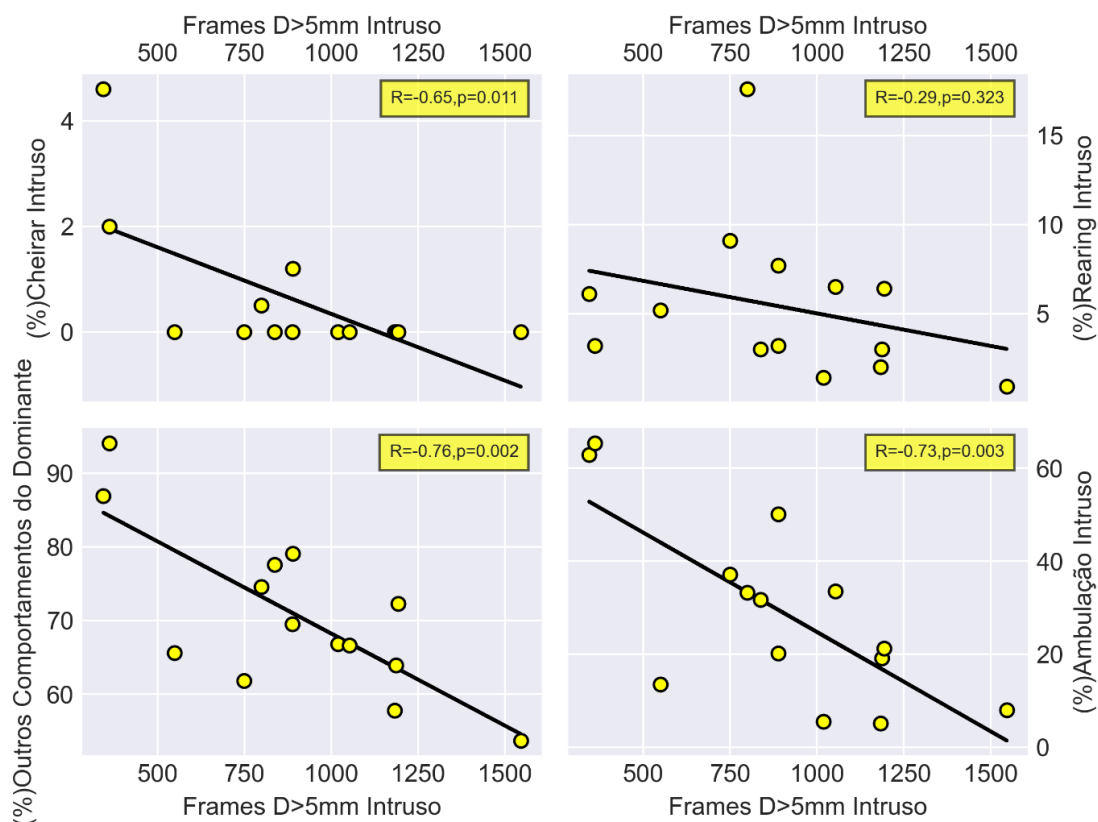


Figura 86: Correlação superior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior do que 5mm e o percentual do tempo gasto cheirando o intruso($R=-0.65$, $p=0.011$). Correlação superior direita: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior do que 5mm e o percentual do tempo gasto em rearing pelo intruso ($R=-0.29$, $p=0.323$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior do que 5mm e percentual do tempo gasto em outros comportamentos (não agressivos) pelo dominante($R=-0.76, p=0.002$). Correlação inferior direita: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior do que 5mm e percentual do tempo gasto em ambulação pelo intruso($R=-0.73, p=0.003$).[\[la85\]](#)

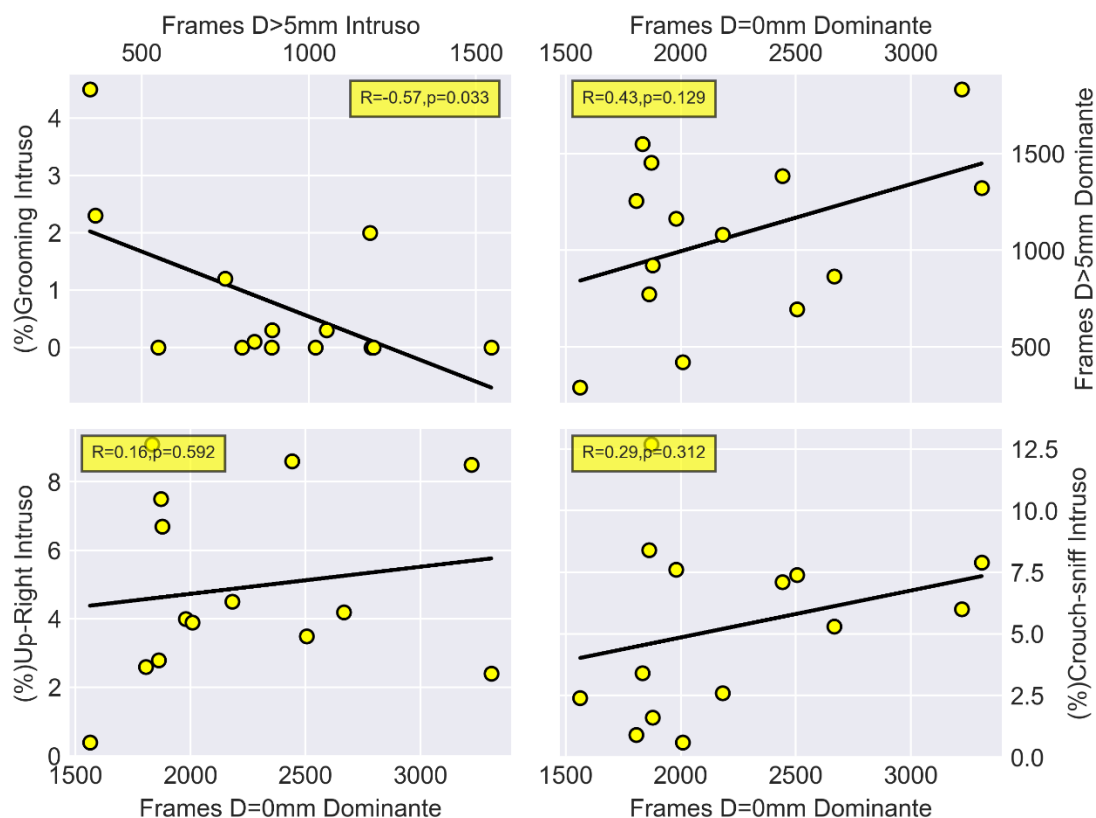


Figura 87: Correlação superior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do intruso foi maior do que 5mm e o percentual do tempo gasto em grooming pelo intruso($R=-0.57$, $p=0.033$). Correlação superior direita: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante e a quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior do que 5mm($R=0.43$, $p=0.129$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante e o percentual de tempo gasto em Up-right pelo intruso($R=0.16$, $p=0.592$). Correlação inferior direita: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante e percentual do tempo gasto em crouch sniff pelo intruso($R=0.29$, $p=0.312$).^[a86]

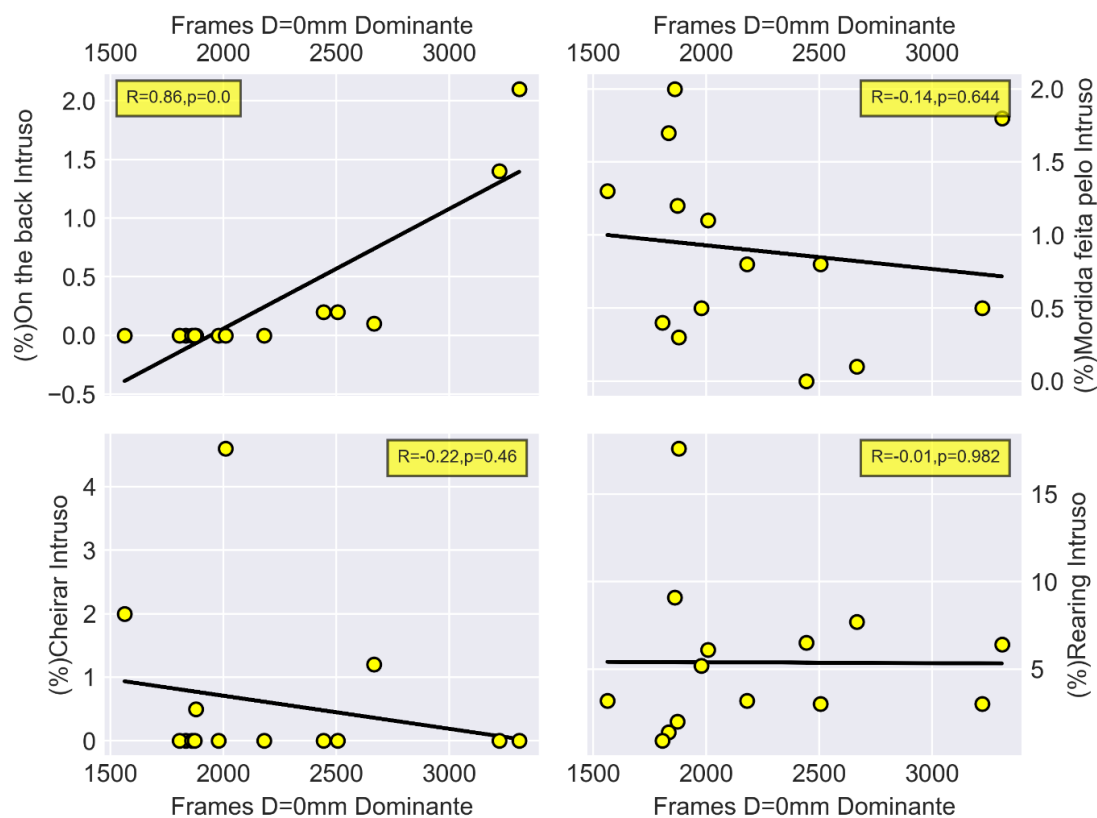


Figura 88: Correlação superior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante e o percentual do tempo gasto em on the back pelo intruso($R=0.86$, $p<0.001$). Correlação superior direita: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante e percentual do tempo gasto mordendo o dominante($R=-0.14$, $p=0.644$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante e o percentual do tempo cheirando o dominante($R=-0.22$, $p=0.46$). Correlação inferior direita: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante e percentual do tempo gasto em rearing pelo intruso($R=-0.01$, $p=0.982$).^[1a87]

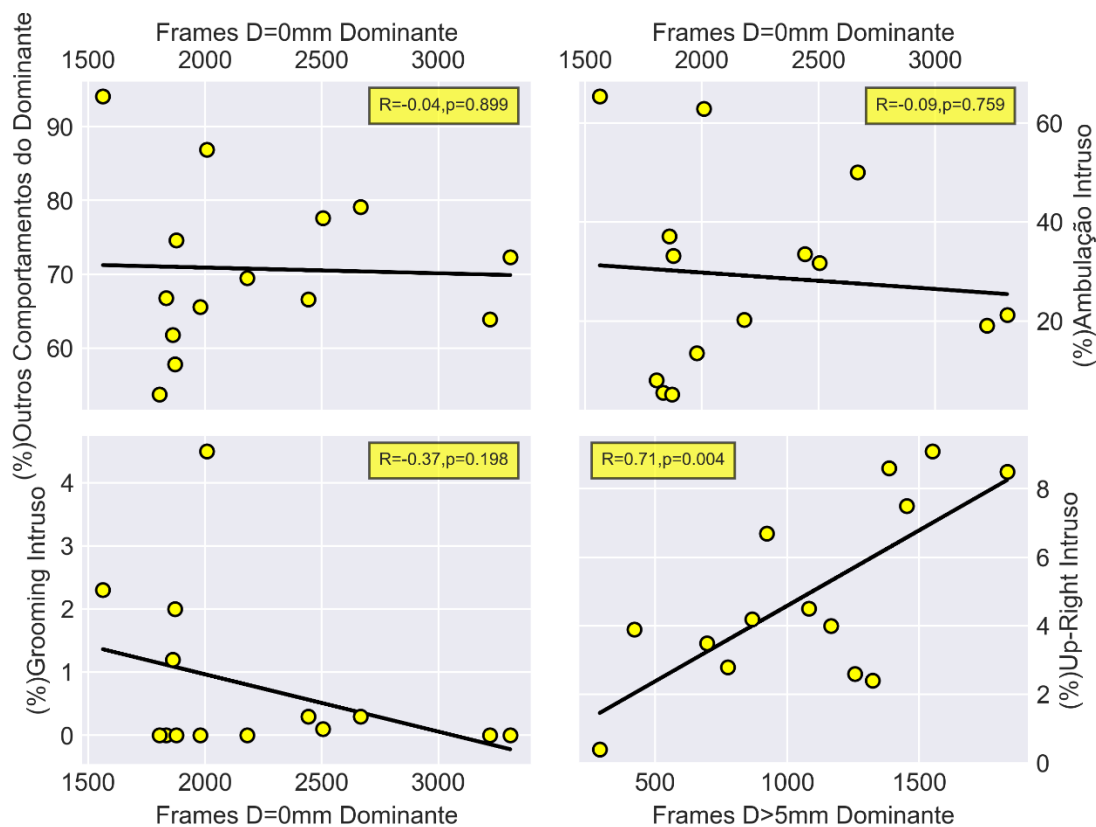


Figura 89: Correlação superior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante e o percentual do tempo gasto em outros comportamentos (não agressivos) pelo dominante ($R=-0.04$, $p=0.899$). Correlação superior direita: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante e percentual do tempo gasto em ambulação pelo intruso ($R=-0.09$, $p=0.759$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde não houve movimentação do dominante e o percentual do tempo em grooming pelo intruso ($R=-0.37$, $p=0.198$). Correlação inferior direita: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior do que 5mm e percentual do tempo gasto em Up-Right pelo intruso ($R=0.71$, $p=0.004$).^[a88]

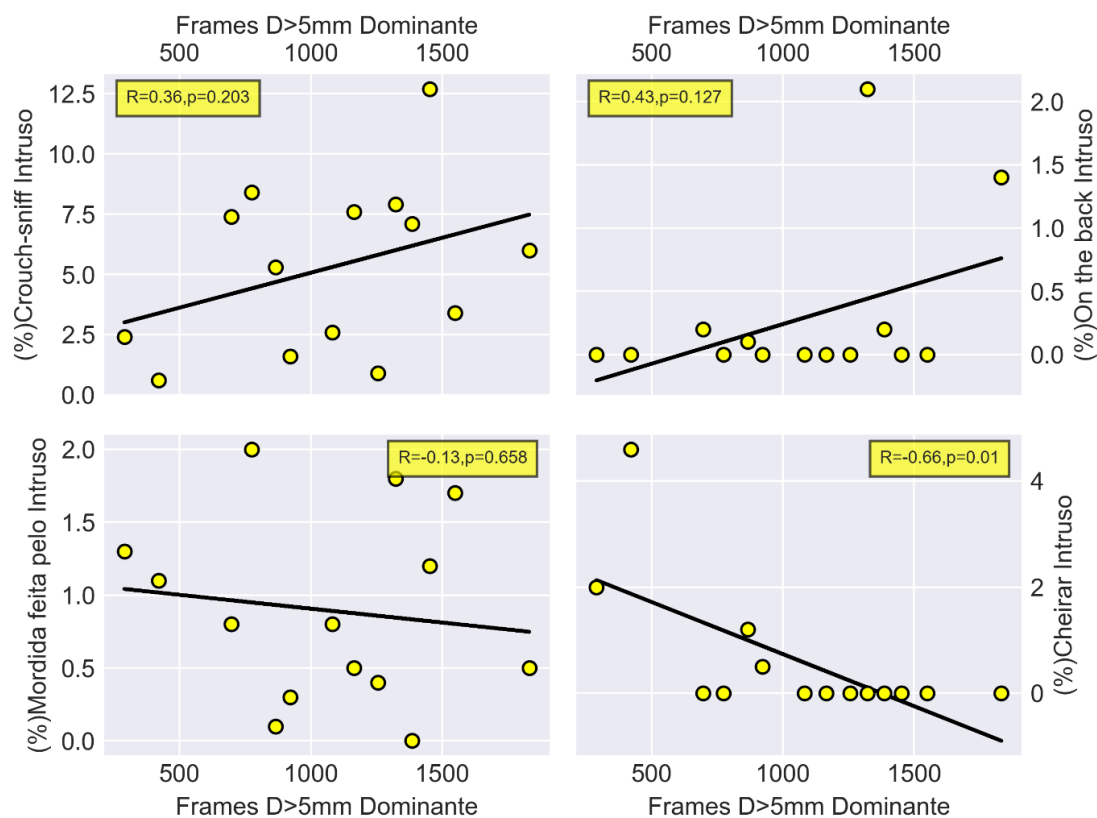


Figura 90: Correlação superior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior que 5mm e o percentual do tempo gasto em crouch-sniff pelo intruso($R=0.36$, $p=0.203$).
 Correlação superior direita: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior do que 5mm e percentual do tempo gasto em on the back pelo intruso($R=0.43$, $p=0.127$).
 Correlação inferior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior do que 5mm e o percentual do tempo gasto realizando mordidas no dominante($R=-0.13, p=0.658$).
 Correlação inferior direita: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior do que 5mm e percentual do tempo gasto cheirando o dominante($R=-0.66, p=0.01$). [a89]

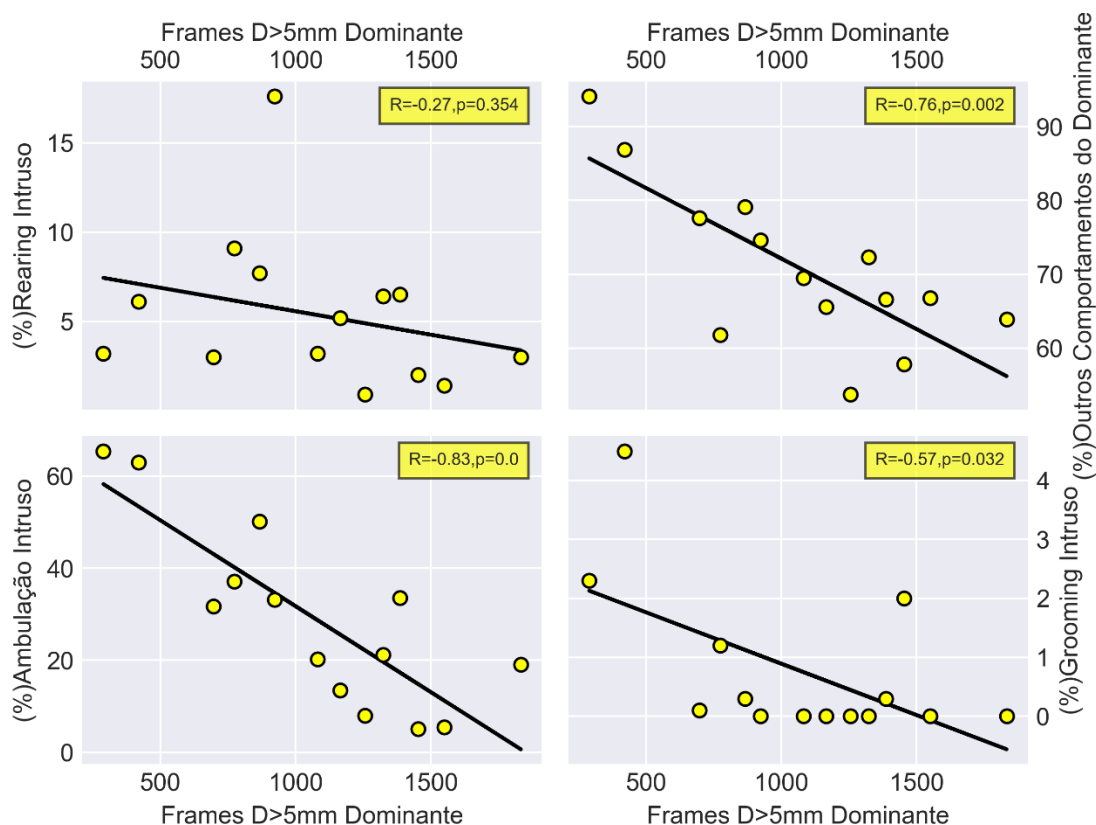


Figura 91: Correlação superior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior que 5mm e o percentual do tempo gasto em rearing pelo intruso($R=-0.27, p=0.354$). Correlação superior direita: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior que 5mm e percentual do tempo gasto em outros comportamentos(não agressivos) realizados pelo dominante($R=-0.76, p=0.002$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior do que 5mm e o percentual do tempo gasto em ambulação pelo intruso($R=-0.83, p=0.001$). Correlação inferior direita: Correlação entre quantidade de frames onde a movimentação do dominante foi maior do que 5mm e percentual do tempo gasto em grooming pelo intruso($R=-0.57, p=0.032$).^[190]

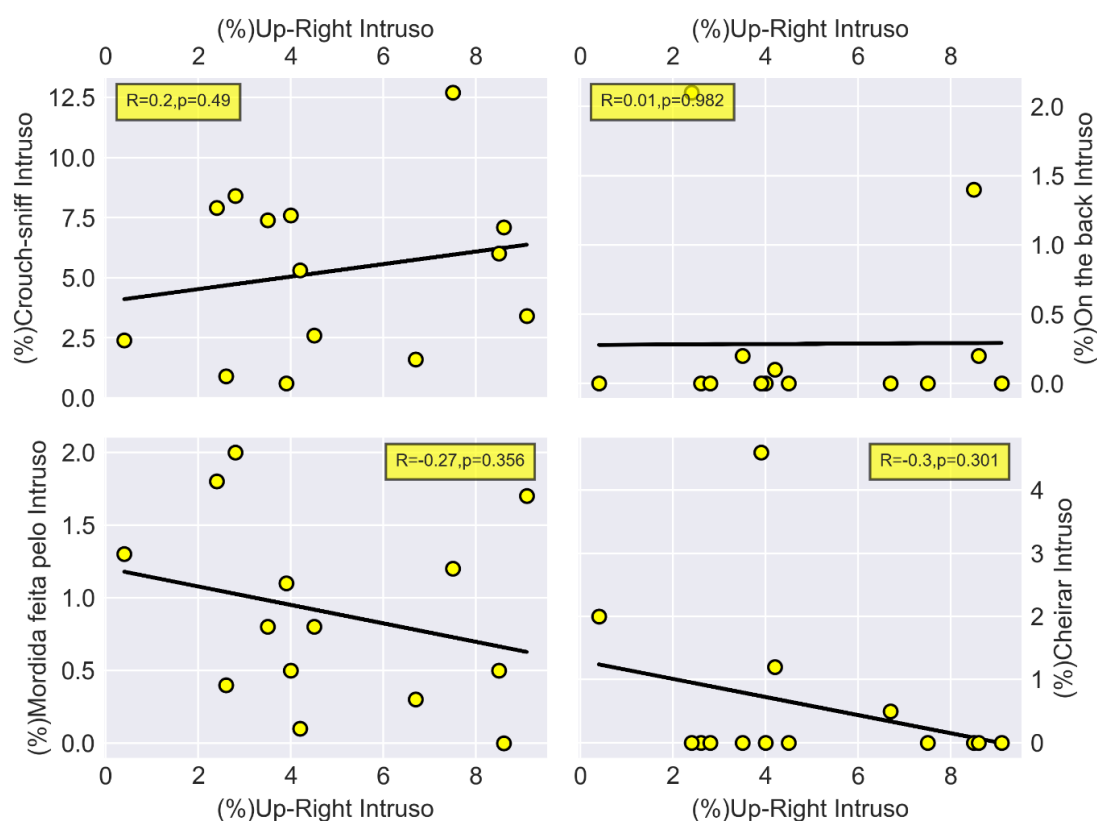


Figura 92: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em Up-right pelo intruso e percentual gasto em Crouch-sniff ($R=0.2, p=0.49$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em Up-right pelo intruso e percentual do tempo gasto em on the back ($R=0.01, p=0.982$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em Up-right pelo intruso e o percentual do tempo gasto mordendo o dominante ($R=-0.27, p=0.356$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em Up-right pelo intruso e percentual do tempo gasto cheirando o dominante ($R=-0.3, p=0.301$). [a91]

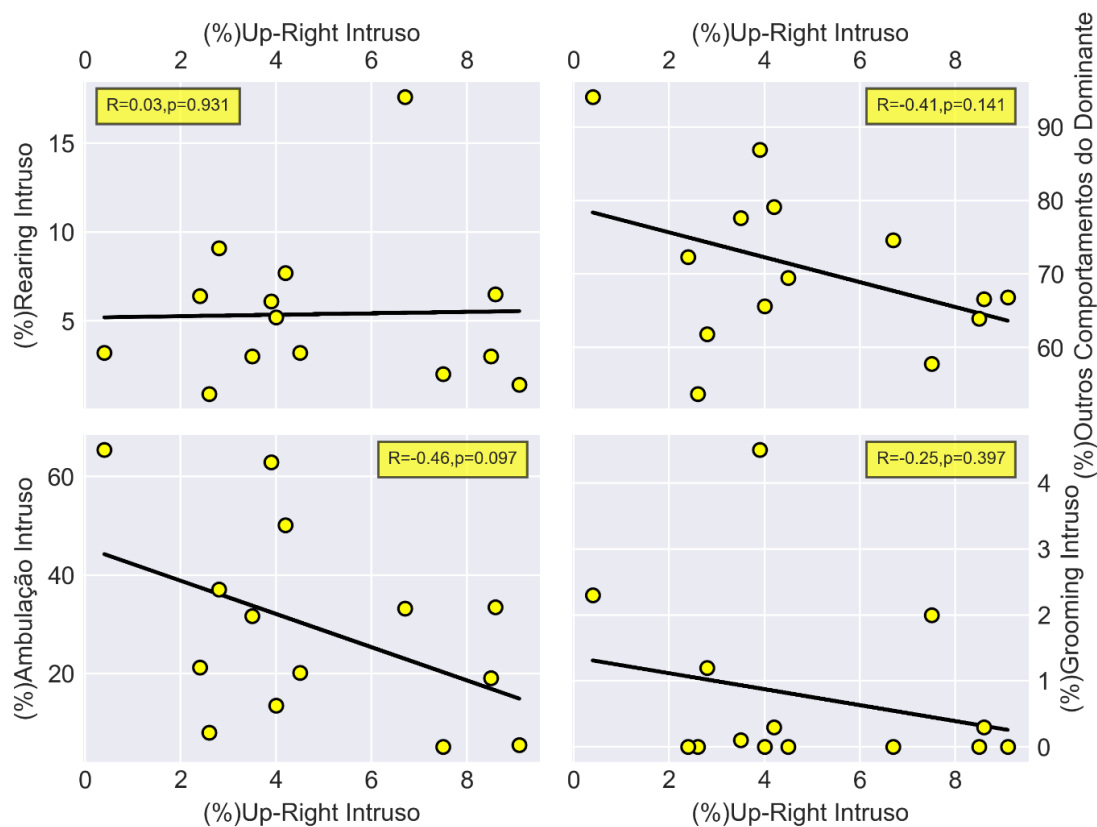


Figura 93: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em Up-right pelo intruso e percentual gasto em rearing ($R=0.03, p=0.931$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em Up-right pelo intruso e percentual do tempo gasto em outros comportamentos (não agressivos) pelo intruso ($R=-0.41, p=0.141$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em Up-right pelo intruso e o percentual do tempo gasto em ambulação pelo intruso ($R=-0.46, p=0.097$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em Up-right pelo intruso e percentual do tempo gasto em grooming pelo intruso ($R=-0.25, p=0.397$). [la92]

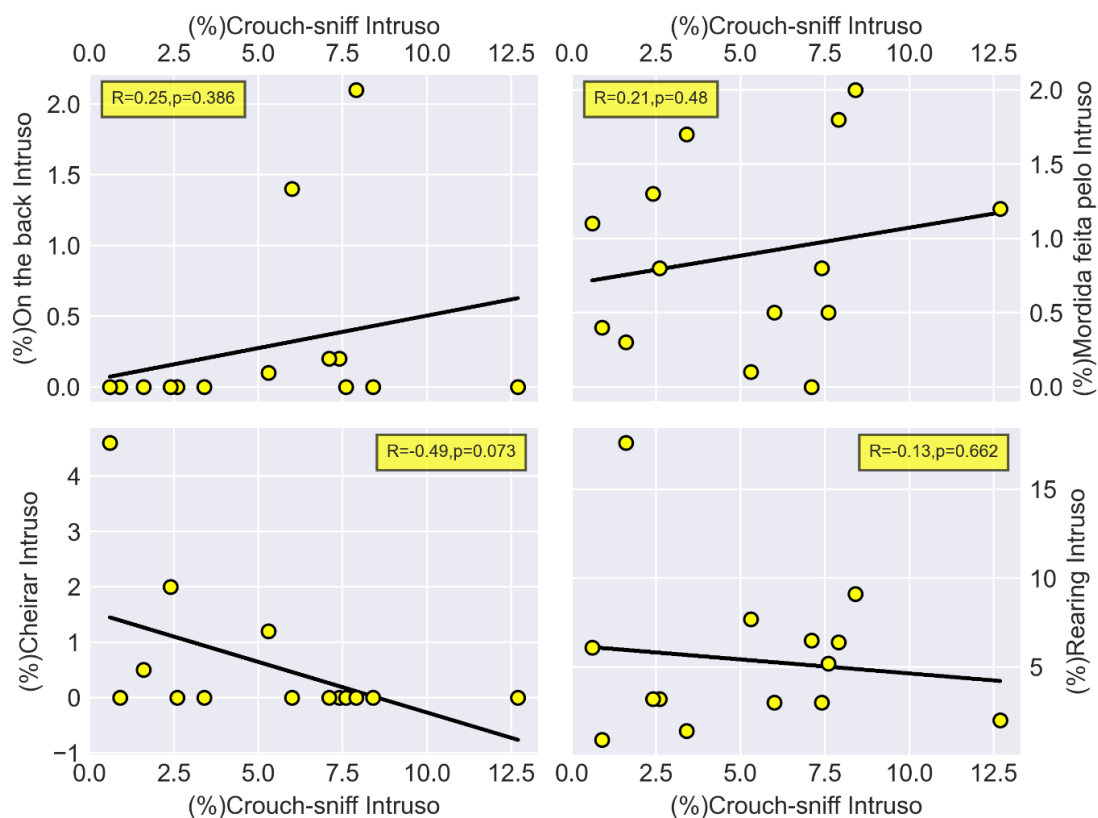


Figura 94: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em Crouch-Sniff pelo intruso e percentual gasto em on the back ($R=0.25, p=0.386$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em Crouch-Sniff pelo intruso e percentual do tempo gasto mordendo o dominante ($R=0.21, p=0.48$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em Crouch-Sniff pelo intruso e o percentual do tempo gasto cheirando o dominante ($R=-0.49, p=0.073$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em Crouch-Sniff pelo intruso e percentual do tempo gasto em rearing pelo intruso ($R=-0.13, p=0.662$). [la93]

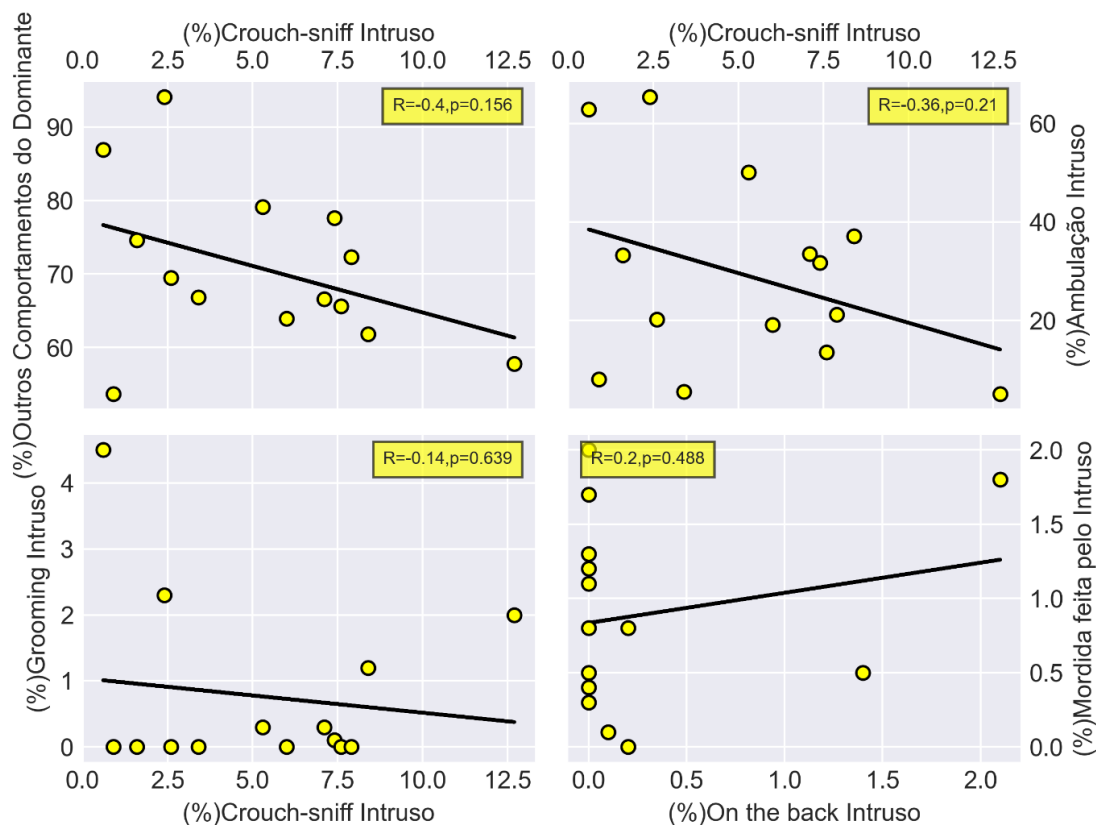


Figura 95: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em Crouch-Sniff pelo intruso e percentual gasto em outros comportamentos (não agressivos) pelo dominante($R=-0.4$, $p=0.156$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em Crouch-Sniff pelo intruso e percentual do tempo gasto em ambulação pelo intruso($R=-0.36$, $p=0.21$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em Crouch-Sniff pelo intruso e o percentual do tempo gasto em grooming pelo intruso($R=-0.14$, $p=0.639$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em Crouch-Sniff pelo intruso e percentual do tempo gasto em on the back pelo intruso($R=-0.2$, $p=0.488$). [a94]

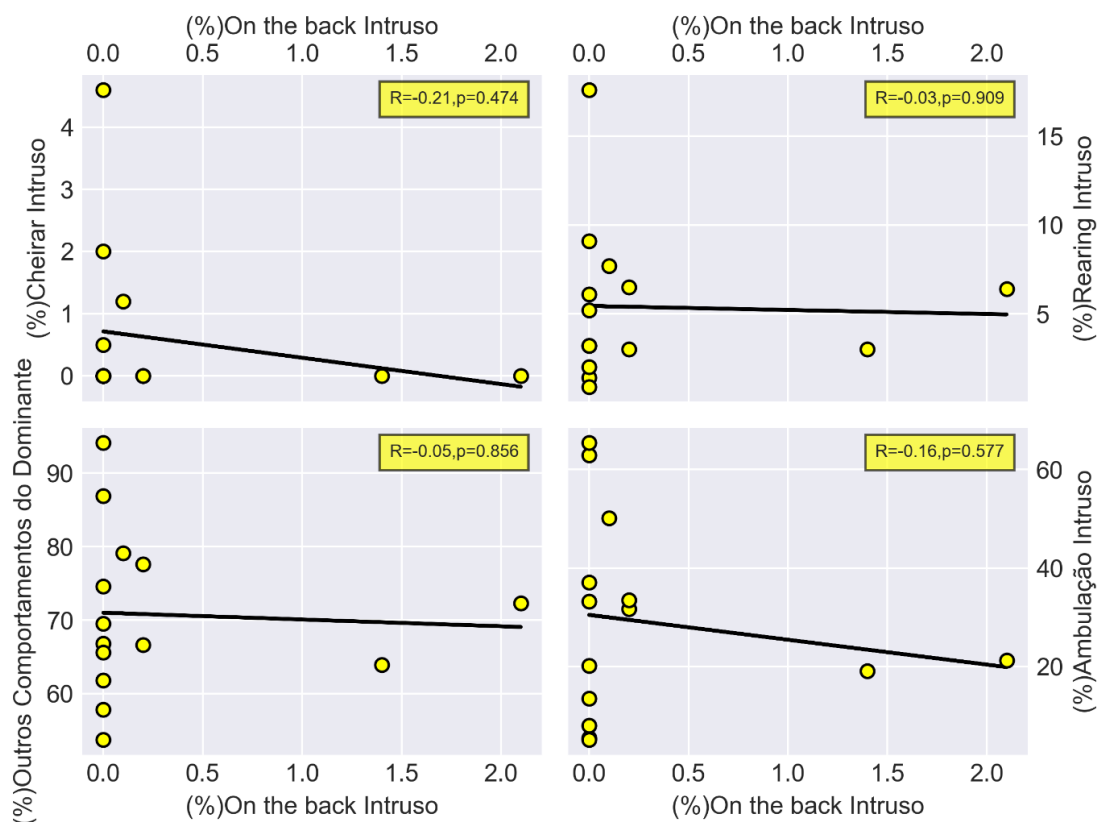


Figura 96: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em On the back pelo intruso e percentual gasto cheirando o dominante ($R=-0.21$, $p=0.474$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em On the back pelo intruso e percentual do tempo gasto em rearing pelo intruso ($R=-0.03$, $p=0.909$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em On the back pelo intruso e o percentual do tempo gasto em outros comportamentos (não agressivos) pelo dominante ($R=-0.05$, $p=0.856$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em On the back pelo intruso e percentual do tempo gasto em ambulação pelo intruso ($R=-0.16$, $p=0.577$). [la95]

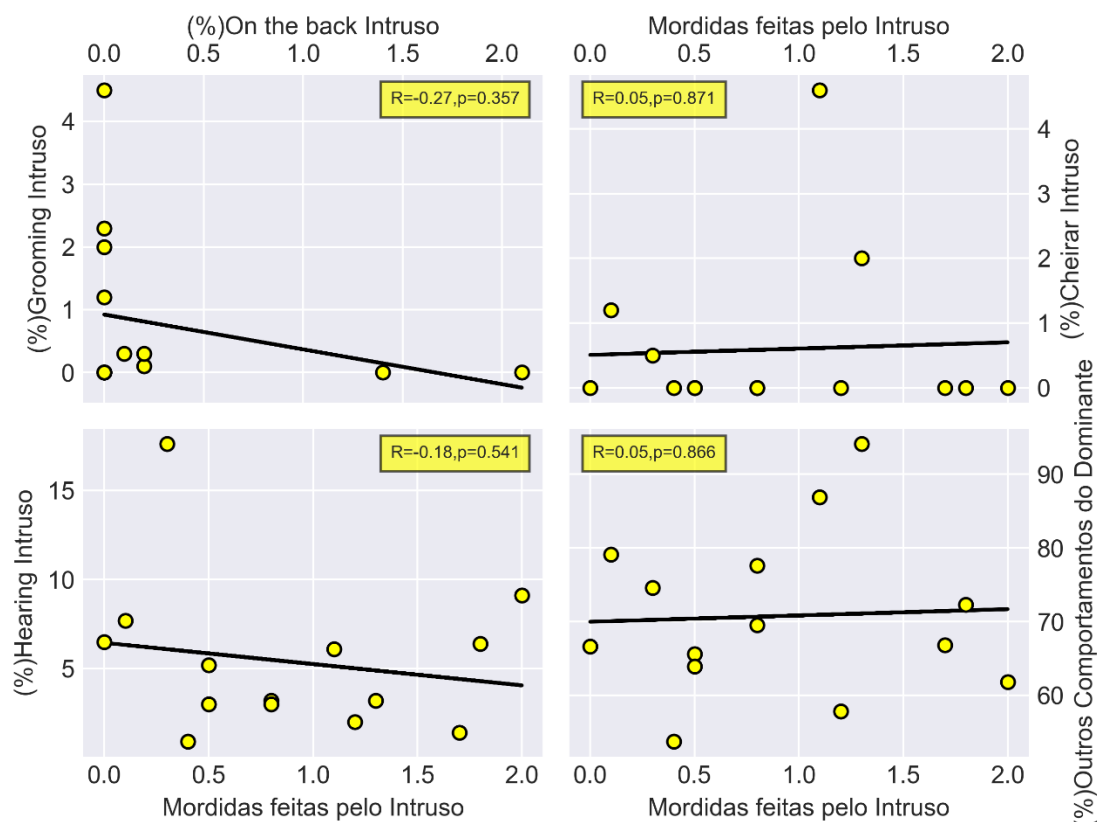


Figura 97: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em On the back pelo intruso e percentual gasto em grooming pelo intruso ($R=-0.27$, $p=0.357$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto mordendo o dominante e percentual do tempo cheirando o dominante ($R=0.05$, $p=0.871$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto mordendo o dominante e o percentual do tempo gasto em rearing pelo intruso ($R=-0.18$, $p=0.541$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto mordendo o dominante e percentual do tempo gasto em outros comportamentos (não agressivos) pelo dominante ($R=0.05$, $p=0.866$). [a96]

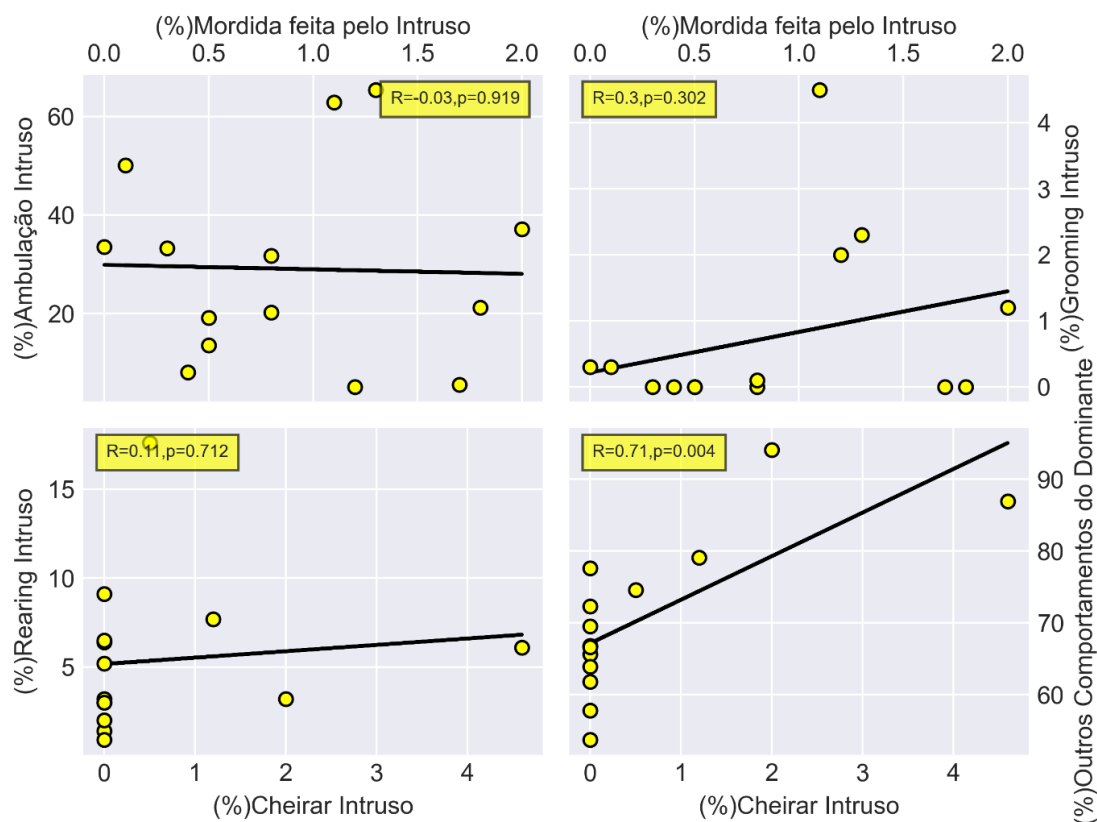


Figura 98: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto mordendo o dominante e percentual gasto em ambulação pelo intruso ($R=-0.03$, $p=0.919$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto mordendo o dominante e percentual do tempo gasto em grooming pelo intruso ($R=0.3$, $p=0.302$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto cheirando o dominante e o percentual do tempo gasto em rearing pelo intruso ($R=0.11$, $p=0.712$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto cheirando o dominante e percentual do tempo gasto em outros comportamentos (não agressivos) pelo dominante ($R=0.71$, $p=0.004$). [la97]

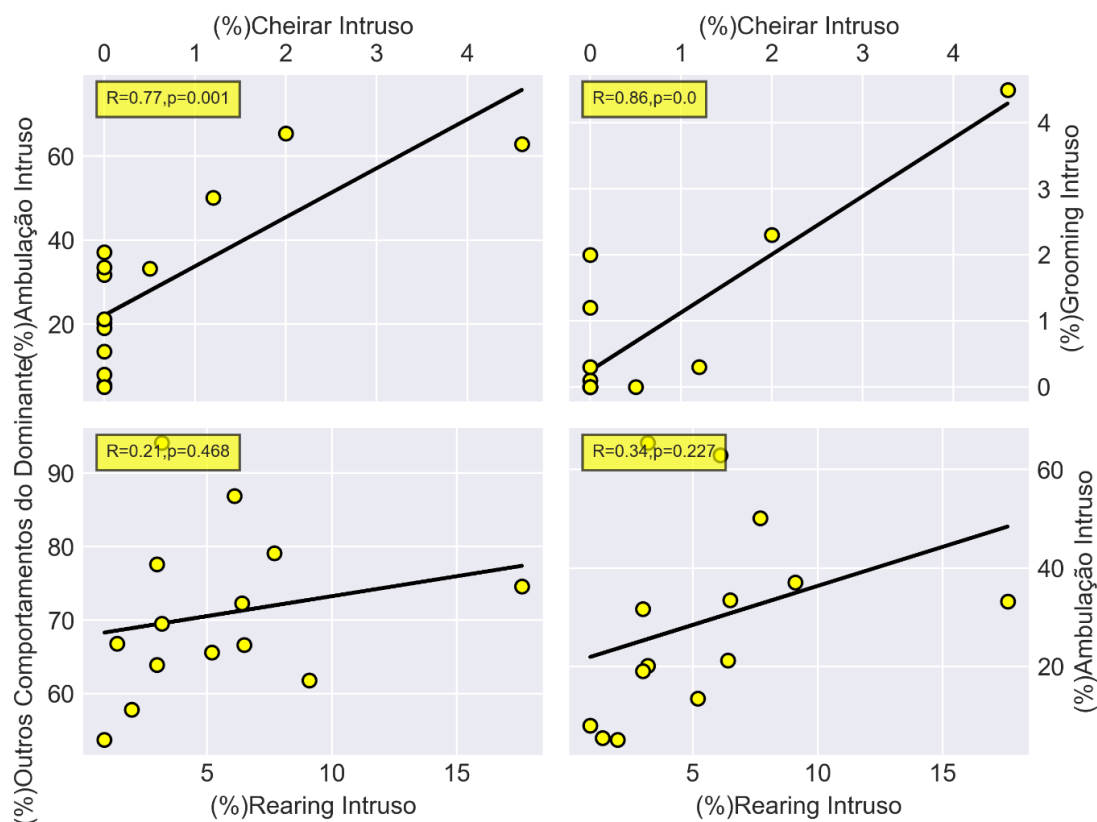


Figura 99: Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto cheirando o dominante e percentual gasto em ambulação pelo intruso ($R=0.77$, $p=0.001$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto cheirando o dominante e percentual do tempo gasto em grooming pelo intruso ($R=0.86$, $p=< 0.001$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em rearing pelo intruso e o percentual do tempo gasto em outros comportamentos (não agressivos) pelo dominante ($R=0.21$, $p=0.468$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em rearing pelo intruso e percentual do tempo gasto em ambulação pelo intruso ($R=0.34$, $p=0.227$). [1a98]

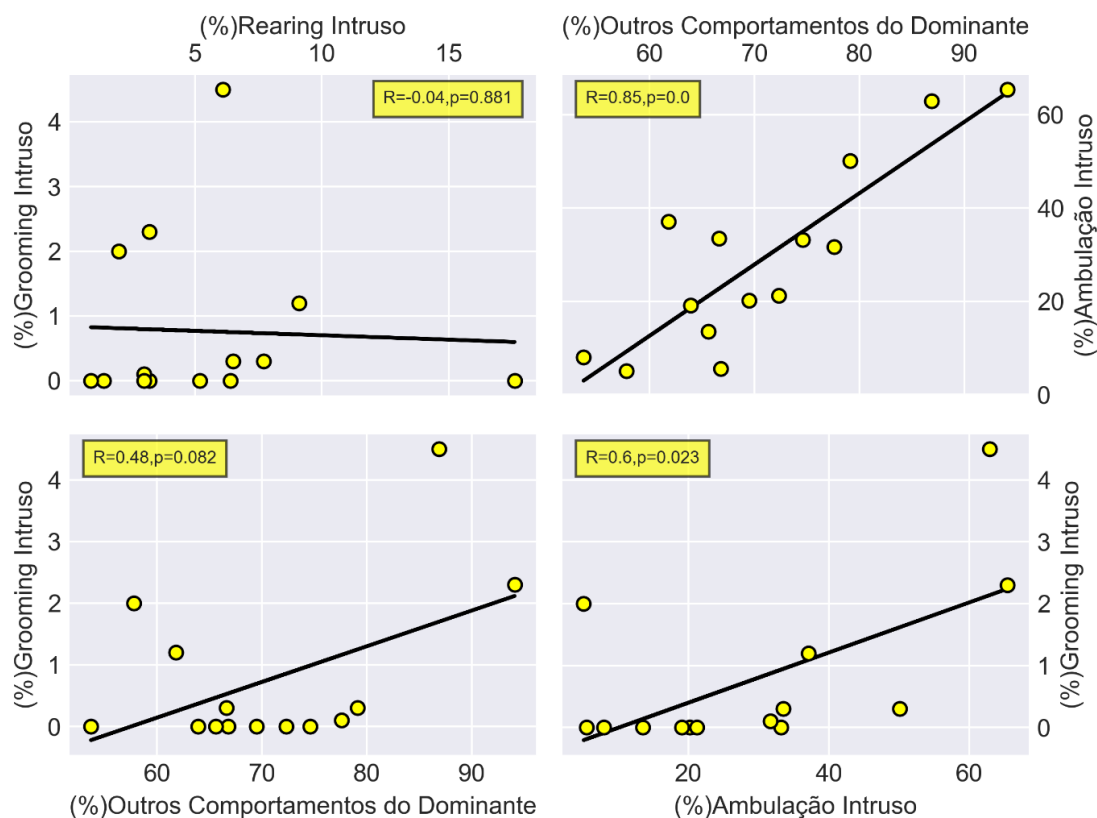



Figura 100:Correlação superior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em rearing pelo intruso e percentual gasto em grooming pelo intruso ($R = -0.04$, $p = 0.881$). Correlação superior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em outros comportamentos pelo dominante (não agressivos) e percentual do tempo gasto em ambulação pelo intruso ($R = 0.85$, $p < 0.001$). Correlação inferior esquerda: Correlação entre percentual do tempo gasto em outros comportamentos pelo dominante (não agressivos) e o percentual do tempo gasto em grooming intruso ($R = 0.21$, $p = 0.468$). Correlação inferior direita: Correlação entre percentual do tempo gasto em grooming pelo intruso e percentual do tempo gasto em ambulação pelo intruso ($R = 0.6$, $p = 0.023$). [a99]

Anexo 2:


Heliyon 8 (2022) e10243



Contents lists available at [ScienceDirect](#)


Heliyon

journal homepage: www.cell.com/heliyon



Research article

Failure of AAV retrograde tracer transduction in hypothalamic projections to the periaqueductal gray matter



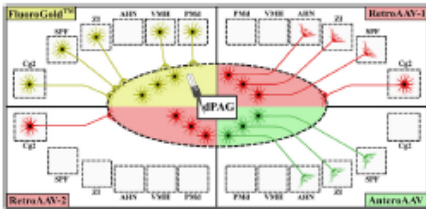
João Guilherme Tassoni Bortoloci, Simone Cristina Motta^{*}

Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cidade Universitária, São Paulo 05508-900, Brazil

HIGHLIGHTS

- The use of AAVs to examine neural circuits is growing and well accepted, but some limitations should be considered.
- We used two commercially available retrograde AAV, which failed to infect hypothalamic neurons.
- One of two commercially available retrograde AAV tested also showed significant anterograde labeling.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:
 Adeno-associated virus
 Retrograde tracing
 Anterograde tracing
 Connectomics
 Periaqueductal gray matter
 Hydroxystilbamidine

ABSTRACT

Connectomics is an important field of neuroscience that examines how neurons are connected and form functional circuits that underlie the brain's functions. Conventional tracers based on dye have led to great advances in mapping these connections, and now, neurotropic viruses are contributing to connectomics. In this work, two retrograde adeno-associated virus failed to transduce in projections from hypothalamic neurons to periaqueductal gray matter (PAG) but worked well in cortical connections to PAG. One of this virus also marked a substantial amount of PAG efferent projections, therefore working as an anterograde tracer. We also used hydroxystilbamidine (FluoroGold™) as a gold standard in retrograde tracing for comparison with the projections shown by the retrograde virus. As determined in past works, FluoroGold™ shows connections from the hypothalamus and cortex to the PAG. Also, an anterograde AAV was compared with one of the retrograde AAV, which showed a similar pattern of axonal projections and terminal fields. Hence, although neurotropic viruses are revolutionizing connectomics and other areas, their mechanism, neurotropism, and cell invasion need to be addressed. Their use is a great challenge and requires further studies to clarify their interaction with the nervous system's cells.

1. Introduction

The structural and functional units of the nervous system were defined long ago as “nerve cells” by the neuron doctrine, which was mainly achieved using techniques such as Golgi's method (Swanson, 2000; Güllery, 2005). This doctrine states that these functional units

(now known as neurons) communicate at sites of cell-to-cell contact with a space between them, which were defined later as synapses (Güllery, 2005). Neuroscience has since confirmed most of this doctrine, showing that neurons connect to each other through neurites and synapses in a great number of functional circuits (Sun et al., 2019). The field of connectomics was born with the objective of mapping these circuits across

^{*} Corresponding author.
E-mail address: sim.motta@usp.br (S.C. Motta).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10243>
 Received 15 February 2022; Received in revised form 25 May 2022; Accepted 5 August 2022
 2405-8440/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Figura 101: Página 1 da publicação Failure of AAV retrograde tracer transduction in hypothalamic projections to the periaqueductal gray matter. [a100]

the brain in different species, which are thought to underlie functions such as cognition, emotion, memory, sensation, and movement (Lanciego and Wouterlood, 2011; Saleeba et al., 2019; Sun et al., 2019).

As stated by Saleeba et al. (2019), conventional tracers can be stained by immunohistochemical, intrinsic fluorescence, or conjugation processing and visualized by light microscopy for use as retrograde or anterograde tracers. Starting around 1970, conventional tracers led to a revolution in neuroanatomy and an avalanche of data on unknown neural connections (Swanson, 2000). Basically, retrograde tracers deposited in the terminals of neurons are transported back to cell bodies (Lanciego and Wouterlood, 2011; Saleeba et al., 2019). One example of this class of tracer is hydroxystilbamidine (FluoroGold™), which is considered as a “gold-standard” tracer (Lanciego and Wouterlood, 2011; Saleeba et al., 2019) or “robust synthetic retrograde tracer” (Teruo et al., 2016). FluoroGold™ is taken up into nerve terminals through endocytosis and transported retrogradely to cell bodies (Saleeba et al., 2019).

Neurotropic viruses, such as adeno-associated viruses (AAVs), are currently leading to great advancements in neuroscience, not only as tracers in connectomics, but also in imaging neuronal activity, pharmacogenetics, and optogenetics (Sun et al., 2019). Used as tracers, neurotropic viruses have advantages compared to conventional tracers in terms of specificity since conventional tracers tag most of the neurons that they have contact with. Once cell types are defined by particular gene expression and other factors, specific cell populations can be targeted differently by neurotropic viruses and transgenic approaches with animal models. This enables the manipulation of specific neuronal populations defined by chemical identity or particular gene expression, which provides further understanding of circuits throughout the brain (Luo et al., 2018).

The hypothalamus is a necessary structure for survival and coordinates neuroendocrine, autonomic, and behavioral responses. The hypothalamic medial nuclei column is involved in defensive behaviors and is composed of the medial preoptic nucleus, anterior hypothalamic nucleus (AHN), descending division of the paraventricular nucleus, ventromedial nucleus (VMH), adjacent tuberal nucleus, dorsal (PMd), and the ventral pre-mammillary nucleus and mammillary body (Swanson, 2000).

The periaqueductal gray matter (PAG) is a mesencephalic structure that is subdivided in four columns known as dorsomedial (dmPAG), dorsolateral (dlPAG), lateral (lPAG) and ventrolateral (Bandler et al., 2000). Dorsal PAG (dPAG) stands as the union of dorsomedial and dorsolateral columns. Both receive inputs from different areas across encephalon, as medial prefrontal cortex (Franklin et al., 2017), zona incerta (ZI) (Chou et al., 2018), VMH (Canteras et al., 1994; Lindberg et al., 2013; Wang et al., 2015, 2019; Carvalho et al., 2020) and PMd (Canteras and Swanson, 1992; Motta et al., 2009; Wang et al., 2021a,b). The PAG is involved in a wide array of functions, including defensive behaviors (LeDoux, 2012; Motta et al., 2017). Defensive behaviors are processed in different structures and circuits when executed in response to a conspecific aggressor or a predator. When faced by a predator, rat's defensive behavior is coordinated by the dorsomedial portion of VMH and ventrolateral portion of PMd. Those subdivisions have anterograde projections to dlPAG and dmPAG activating both columns when faced by a predator. On the other hand, while threatened by a conspecific, ventrolateral portion of VMH and dorsomedial portion of PMd activates dmPAG and lPAG (Motta et al., 2009). Therefore, dmPAG and dlPAG receive dense projections from both VMH and PMd, known to be related to defensive behaviors (Canteras and Swanson, 1992; Canteras et al., 1994, 2015; Motta et al., 2009; Gross and Canteras 2012; Silva et al., 2013; Lindberg et al., 2013; Wang et al., 2015, 2019, 2021a,b; Carvalho et al., 2020).

The role of hypothalamic projections to dPAG in defensive behaviors against predators and conspecifics (Motta et al., 2009, 2017; Gross and Canteras 2012) is considerably studied. However, further detailing of such circuits, mainly regarding neural populations morphology and physiology, would greatly benefit from the application of properly

functioning neurotropic viruses. Taking this into account, the present work examines the ability of AAV retrograde tracers to transduce known afferent connections to dPAG. It also examines whether retrograde AAV tracers also work as anterograde tracers.

2. Experimental procedures

2.1. Animals

Experiments were done using adult male C57BL/6 (n = 30) and Vglut^{CRF} mice (n = 8) at approximately 70–140 days of age at the time of surgery. Food and water were available ad libitum to the animals in light-controlled (07:00 AM to 07:00 PM) and temperature-controlled (24–26 °C) rooms. The animal housing and all experimental procedures were conducted according to the institutional guidelines of the National Council for Animal Experimentation Control and Animal Ethics Committee of the Institute of Biomedical Sciences (CEUA# 978 2090821).

2.2. Retrograde and anterograde tracing experiments with FluoroGold™ or AAVs

To deposit FluoroGold™ (FG, n = 18, 9 of them were included in the analyses), C57BL/6 animals were anesthetized with Isoflurane (Isoflurano, Cristália, 2.5–1.5%), and unilateral iontophoretic deposits of a 2% solution of FluoroGold™ (Fluorochrome Inc., Colo, USA) were placed stereotaxically into the dPAG (AP = -3.95 mm, ML = 0 mm, DV = -2.35 mm). Deposits were made over 5 min through a glass micropipette (tip diameter: 24 µm) by applying a +3-µA current pulsed at 7-second intervals with a constant current source (Midgard Electronics, Wood Dale, Ill, USA, model CS3). In the case of AAV injections, AAV5-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-PA (anteroAAV, n = 8, C57BL/6), AAV Retro-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-mCherry-WPRE-HGHpA (retroAAV-1, n = 8, 5 of them were included in the analysis, Vglut^{CRF}) and AAV Retro-EF1a-mCherry-IRES-Cre (retroAAV-2, n = 4, C57BL/6) (Addgene) were injected with a microsyringe (Hamilton 0.5 µl) placed stereotaxically into the dPAG (AP = -3.95 mm, ML = 0 mm, DV = -2.35 mm) using an automatic pump (Harvard Apparatus, pump11 elite), volume (7–15 nl). The mice used to describe retrograde AAV (VGLUT-DM-V32-7) and anterograde AAV (WT-DM-V5-7) had infusion volumes of 7 and 15 nl, respectively.

2.3. Tissue processing and cell counting

After survival times of 7 days for FluoroGold™ deposits and 30 days or more for AAV injections, the animals were deeply anesthetized with Isoflurane and perfused transcardially with saline solution, followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4. After the perfusion, the encephalon was removed from the skull and left overnight in a solution of 20% sucrose in 0.1 M phosphate buffer at 4 °C. The brains were then frozen, four series of 40-µm-thick sections were cut on a sliding microtome in the transverse (frontal) plane, and sections were collected from the caudal brainstem through the rostral tip of the prefrontal cortex. One complete series was processed for each animal.

Immunohistochemistry analysis was performed for one series of animals that received FluoroGold™ (FG group) deposits using an antiserum directed against FluoroGold™ (Chemicon International, Calif, USA) at a dilution of 1:10,000. The antigen-antibody complex was localized with a variation of the avidin-biotin complex system (ABC) and a commercially available kit (ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Calif, USA). The sections were mounted on gelatin-coated slides, dehydrated, and covered with DPX. Sections were examined under a bright-field microscope. For visualization of viral retrograde and anterograde projections, sections were mounted on slides and visualized using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i). Figures were prepared using Inkscape (1.0.1). For neuroanatomical and Bregma referencing, The Mouse Brain atlas was used (Franklin and Paxinos 2007).

Retrogradely labeled cells were quantified in PMd, VMH and Cg2 for animals in retroAAV-1, retroAAV-2 and FG groups. ImageJ software (1.52a) were used to count neurons and calculate area, resulting in neuronal density by mm². Data processing, visualization and statistical analyses were done using anaconda platform (conda 4.12.0) for python programming language (3.8.8) and libraries: pandas (1.2.4), numpy (1.20.1) matplotlib (3.3.4) and scipy (1.6.2). Some groups did not show normal distribution and groups were analyzed using Mann-Whitney test ($\alpha = 0.05$).

3. Results

3.1. retroAAV-1 and retroAAV-2 do not transduce efferent connections from hypothalamus to dPGA, but transduces from Cg2 to dPAG

Eight cases of FG, 5 cases of retroAAV-1 and 4 cases of retroAAV-2 were used to obtain the density of retrograde cells labelled after dPAG injections. Figure 1 shows a comparison between a FG case and a retroAAV-1 case as retrograde tracers deposited (1A) or injected (1E) in the dPAG (Bregma: -3.88 mm), and shows structures that contain retrograde labeled cells in PMd (Bregma: -2.54 mm), VMH (Bregma: -1.7 mm) and Cingulate Cortex Area 2 (Cg2, Bregma: 0.5mm). FluoroGold™ deposits in the case WT-DM-FG-15 (FG group) showed a representative amount of retrogradely labeled cells in PMd (1B and 2B),

VMH (1C and 2A), and Cg2 (1D). However, VGLUT-DM-V32-7 case (group retroAAV-1) showed few retrogradely labeled cells in PMd (1F) and VMH (1G) or none at all. Cg2 showed a considerable number of cells (1H). The comparison shows that FluoroGold™ retrogradely labeled neurons in VMH, PMd, and Cg2. retroAAV-1 failed to transduce neurons in VMH and PMd, but it succeeded in Cg2. Greater magnification of VMH and PMd retrogradely labeled neurons by FluoroGold™ is shown in Figure 2.

Density of retrogradely labeled cells were assessed in PMd, VMH and Cg2 in FG group compared to retroAAVs group (combining retroAAV-1 and retroAAV-2). Mann-Whitney test showed greater efficiency for retrograde labeling of FluoroGold™ compared to retroAAVs in PMd [Figure 3; U = 0, p = 0.00008] and VMH [Figure 3; U = 0; p = 0.0002].

3.2. retroAAV-1 shows similar pattern of anterograde labeling compared to anteroAAV

Five cases of retroAAV-1 group were compared to 8 cases of anteroAAV in terms of efferent projections after dPAG injections. Figure 4 shows representative cases of retroAAV-1 and anteroAAV in comparison as anterograde tracers retroAAV-1 and anteroAAV injections (4A and 4E) show representative amounts of anterograde projections close to or within the subparafascicular thalamic nucleus (4B, 4F, Bregma: -2.3 mm), in ZI, Subl, DM, and a region close to those structures (4C, 4G,

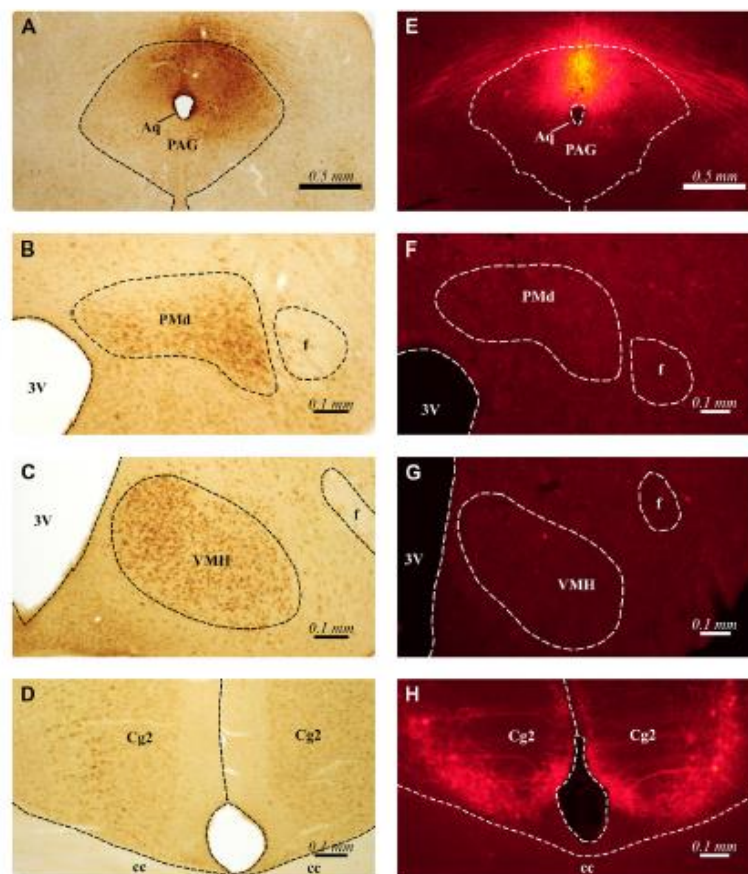


Figure 1. Photomicrograph of frontal sections of retrogradely FluoroGold-positive cells (A, B, C, D) and retroAAV-1 retrogradely positive cells (E, F, G, H), after dPAG injection (A, E, Bregma: -3.88 mm). Retrogradely stained cells are shown in PMd (B, F, Bregma: -2.54 mm), VMH (C, G, Bregma: -1.7 mm) and Cg2 (D, H, Bregma: 0.5 mm). Abbreviations: Aq (aqueduct), PAG (periaqueductal gray matter), 3V (3rd Ventricle), PMd (premamillary nucleus dorsal part), f (fornix), VMH (ventromedial hypothalamic nucleus), Cg2 (cingulate Cortex Area 2), cc (corpus callosum).

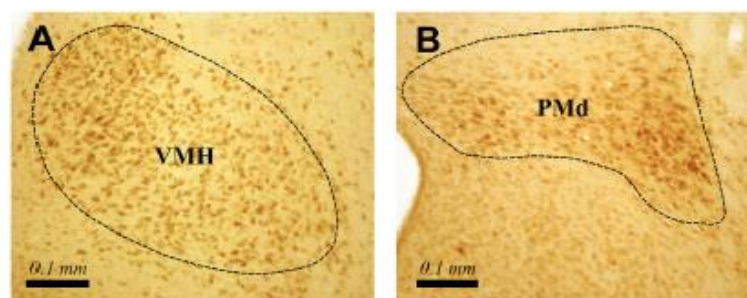


Figure 2. Photomicrograph of frontal sections of retrogradely labeled FluoroGold-positive cells deposited in dPAG. Retrogradely stained cells are shown in VMH (A, Bregma: -1.7 mm) and PMd (B, Bregma: -2.54 mm).

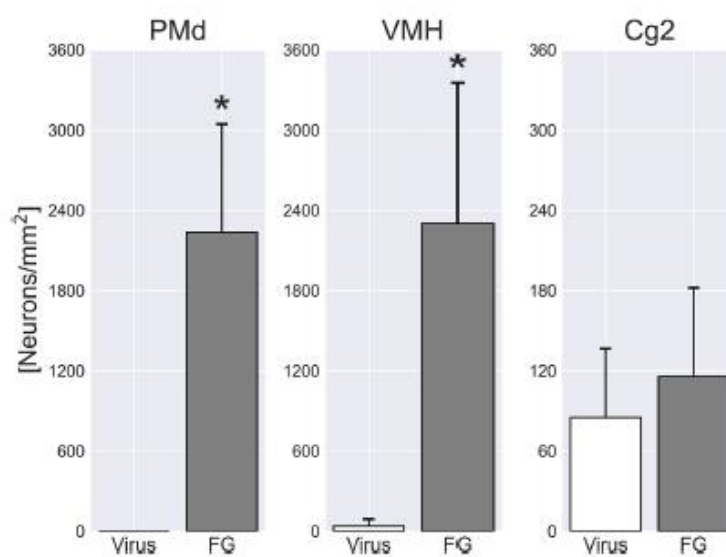


Figure 3. Neuronal density of retrogradely labeled cells after dPAG injection of retroAAVs (retroAAV-1 and retroAAV-2) or FluoroGold™ (FG). Data expressed as mean \pm SD in neurons/mm². Mann-Whitney test. * - $p < 0.05$ compared to the Virus group (retroAAV1 and retroAAV2) in the same structure. Virus (n = 9) and FG (n = 9).

Bregma: -1.46 mm), and in ZI, AHN, and hypothalamic area (4D, 4H, Bregma: -1.22 mm). As a result, retroAAV-1 shows a similar pattern to an anterograde neurotropic viral tracer. It is important to highlight that Figures 1 and 4 show the same animal (VGLUT-DM-V32-7) for retroAAV1 group but different brain areas. The retroAAV-2 group did not show patterns of anterograde projections.

4. Discussion

In neuroscience, the last decade has been marked by many diverse uses of neurotropic viruses. Such tools have been used to trace, manipulate, and note neurons and their physiology, expanding the boundaries of knowledge in neuroscience. However, the use of neurotropic viruses needs attention and may have limitations, particularly when used to describe neuronal projections.

The results presented here indicate the presence of efferent connections from VMH, PMd, and Cg2 to the dPAG in mice. These projections were previously described using techniques with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin, a conventional anterograde tracer in rats (Canteras and

Swanson, 1992; Canteras et al., 1994; Motta et al., 2009) or using anterograde neurotropic tracers from hypothalamic nuclei to dPAG (Silva et al., 2013; Lindberg et al., 2013; Wang et al. 2015, 2019, 2021a,b; Carvalho et al., 2020). Nevertheless, mice injected with retroAAV-1 or retroAAV-2 in dPAG did not present positive cells in VMH and PMd, but they showed positive cells in Cg2. RetroAAV-1 was also able to show a significant amount of efferent dPAG projections, behaving not only as a retrograde tracer but also as an anterograde tracer.

It is important to highlight that injection sites may vary slightly between cases. Sometimes centralized in dmPAG or dIPAG and never restricted to one solely column. Both dmPAG and dIPAG receive dense inputs from PMd and VMH. Differences in the injection site would not explain the difference in our results, especially taking into account that this variation of injection site also exists in the FG group. When analyzing anterograde patterns, differences may exist between dmPAG and dIPAG, but results are focused on their common anterograde projections.

Some hypotheses can explain why hypothalamic neural connections to the dPAG fail to be transduced and why cortical neural connections to the dPAG work well. The main reason could be the technique used to

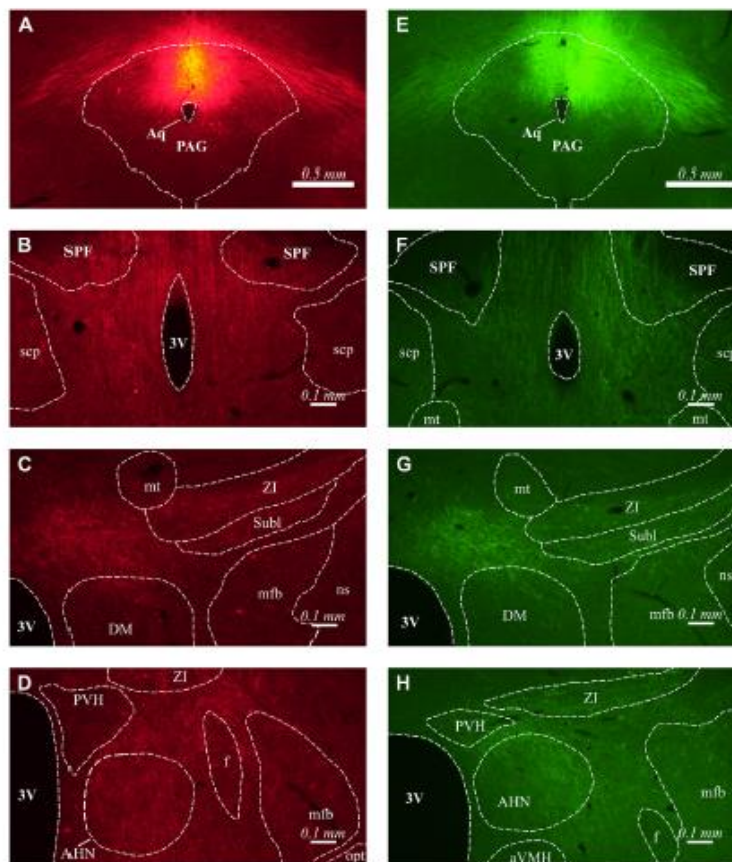


Figure 4. Photomicrograph of frontal sections with terminal fields or axonal projections from retroAAV1 positive cells (A, B, C, D) and from anteroAAV-positive cells (E, F, G, H) both injected in dPAG (A, E). Anterograde projections are shown in a region close to SPF (B, F), close to ZI and DM (C, G), and in AHN (D, H). Abbreviations: Aq (aqueduct), PAG (periaqueductal gray matter), 3V (3rd ventricle), SPF (subparafascicular thalamic nucleus), scp (superior cerebellar peduncle), mt (mammillothalamic tract), ZI (zona incerta), DM (dorsomedial hypothalamic nucleus), Subl (subincertal nucleus), mfb (medial forebrain bundle), f (fornix), ns (nigrostriatal tract), PVH (paraventricular hypothalamic nucleus), AHN (anterior hypothalamic area), opt (optic tract).

design the AAV. A common technique applied for the development of new viral vectors is directed evolution (Kotterman and Schaffer, 2014; Tervo et al., 2016). In this technique, libraries of AAV variants are generated by random processes that increase diversification, and these variants are subjected to selection processes to accumulate beneficial mutations and improve a desired function (Kotterman and Schaffer, 2014).

In the context of engineering new AAVs to study of connectomics and functionality of the encephalon, directed evolution is done using described libraries of AAVs that are subjected to diverse processes to increase diversity. These AAV variants are injected in some structures of the encephalon, and after the transduction period of the AAV, another encephalon structure that sends projections to the injected structure is collected to extract the AAVs for the selection of a new AAV retrograde tracer (Tervo et al., 2016). This process involves an effect of randomness and selection of successful cases without a deep evaluation on how these selected AAVs work differently from the past ones.

In nervous systems, neural populations have considerable differences in cell type. These include the cells' body location, dendritic morphology, axonal projection, physiological characteristics, developmental history, gene expression pattern, and function (Luo et al., 2018). Selection of neurotropic viruses through directed evolution based on a given neural population does not guarantee efficiency to all other neural populations among the great diversity of cell types in the brain. For example, Tervo et al. (2016) used only two independent populations of projections for

the selection of new AAV variants in directed evolution from the substantia nigra pars reticulata and hindbrain neurons to the cerebellar cortex. They tested the new AAV in areas ranging from the basal pontine nuclei to layer V in the cortex. Albeit testing the efficiency of the new AAV variant in different structures, Tervo et al. (2016) observed that some projections presented weak or very weak efficiency.

In the same direction, Sun et al. (2019) explored differences in neurotropism of retro adeno-associated virus (rAAV) and glycoprotein-deleted rabies virus (RV-ΔG). They showed that injections of retrograde tracer in the lateral hypothalamic area (LHA) and medial pre-optic area preferentially label neurons in the cerebral cortex for rAAV and preferentially label neurons in the basal ganglia and hypothalamus for RV-ΔG. In the case of rAAV, the connections of LHA to the paraventricular nucleus of the hypothalamus and of LHA to the nucleus accumbens completely fail to tag retrograde neurons. Another hypothesis was explained by Nathanson et al. (2009), who found that in cortical neurons, a difference in dilution of the same viral vector (AAV) changes the bias of transduction in glutamatergic or gabaergic neurons. This shows a possible preference of transduction for gabaergic instead of glutamatergic neurons in the same structure for the used AAV.

The present results also showed that the commercially available retroAAV-1 that was used may work as an anterograde tracer. The retroAAV-1 tracer showed axonal projections in the thalamus and hypothalamus and terminal fields in the ZI and AHN between other

structures and areas. The same pattern was also observed using a commercially available anterograde AAV. One possible explanation for the retroAAV-1 tracer working as an anterograde tracer could be that AAV2 is naturally transported anterogradely (Salegio et al., 2013).

The rAAV-2 developed by Tervo et al. (2016) was artificially selected through directed evolution to perform retrograde transport, but it is still an AAV2. Therefore, one explanation is that the new variant developed still has the anterograde-transporting feature plus a new ability to infect terminal axons and to be transported retrogradely. Thus, it may work as an anterograde and retrograde tracer at the same time, as observed with retroAAV-1. This dubious functioning may create many misunderstandings and malfunctioning not only when using it as a tracer, but also when using it with functional techniques. In addition, dubious transport could generate second-order anterograde projections from a retrograde transduced structure from the injection site.

5. Conclusion

Neurotropic viruses used as genetic delivery systems are currently revolutionizing connectomics and brain physiology. In the case of AAVs, however, their mechanism, cell invasion, and neurotropism still remain poorly understood (Salegio et al., 2013; Sun et al., 2019). Future studies should provide greater detail about this important tool in neuroscience. When using neurotropic viruses for neural tracing, it is important to have a positive control, such as conventional tracers.

Declarations

Author contribution statement

Bortoloci, J.G.T: Conceived and designed the experiments; Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Motta, S.C: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Funding statement

Dr Simone Cristina Motta was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (#2016/18667-0).

João Guilherme Tassoni Bortoloci was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior.

Data availability statement

Data included in article/supp. material/referenced in article.

Declaration of interest's statement

The authors declare no conflict of interest.

Additional information

No additional information is available for this paper.

References

Bandler, R., Keay, K.A., Floyd, N., Price, J., 2000. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res. Bull.* 53 (1), 95–104.

- Canteras, N.S., Swanson, L.W., 1992. The dorsal preanterior nucleus: an unusual component of the mammillary body. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (21), 10089–10093.
- Canteras, N.S., Simerly, R.B., Swanson, L.W., 1994. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 348 (1), 41–79.
- Canteras, N.S., Pavoni, E., Carobrez, A.P., 2015. Olfactory instruction for fear: neural system analysis. *Front. Neurosci.* 9, 276.
- Carvalho, V.M.A., Nakahara, T.S., Souza, M.A.A., Cardoso, L.M., Tórnio, G.Z., Pliciano, L.G., Venancio, J.D., Stowers, L., Papes, F., 2020. Representation of olfactory information in organized active neural ensembles in the hypothalamus. *Cell Rep.* 32 (8), 108061.
- Chou, X.L., Wang, X., Zhang, Z.G., Shen, L., Zingg, B., Huang, J., Zhong, W., Mesk, L., Zhang, L.L., Tao, H.W., 2018. Inhibitory gain modulation of defense behaviors by zona incerta. *Nat. Commun.* 9 (1), 1151.
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 2007. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, third ed. Academic Press.
- Franklin, T.B., Silva, B.A., Perova, Z., Marone, L., Masferrer, M.E., Zhan, Y., Kaplan, A., Greenham, L., Vecchia, V., Halman, A., Pagella, S., Vyssotski, A.L., Ilarionov, A., Grinevich, V., Bianco, T., Gross, C.T., 2017. Prefrontal cortical control of a brainstem social behaviour circuit. *Nat. Neurosci.* 20 (2), 260–270.
- Gross, C.T., Canteras, N.S., 2012. The many paths to fear. *Nat. Rev. Neurosci.* 13 (9), 651–658.
- Gullery, R.W., 2005. Observations of synaptic structures: origins of the neuron doctrine and its current status. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360, 1281–1307.
- Koterman, M.A., Schaffer, D.V., 2014. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 15 (7), 445–451.
- Landiego, J.L., Wouterlood, F.G., 2011. A half century of experimental neuroanatomical tracing. *J. Chem. Neuroanat.* 42 (3), 157–183.
- LeDoux, J., 2012. Rethinking the emotional brain. *Neuron* 73 (4), 653–676. Erratum in: *Neuron*. 2012 Mar 8;73(5):1052.
- Lindberg, D., Chen, P., Li, G., 2013. Conditional viral tracing reveals that steroidogenic factor 1-positive neurons of the dorsomedial subdivision of the ventromedial hypothalamus project to autonomic efferents of the hypothalamus and hindbrain. *J. Comp. Neurol.* 521 (14), 3167–3190.
- Luo, L., Callaway, E.M., Svoboda, K., 2018. Genetic dissection of neural circuits: a decade of progress. *Neuron* 98 (2), 256–281.
- Motta, S.C., Goto, M., Gouveia, F.V., Baldo, M.V.C., Canteras, N.W., Swanson, L.W., 2009. Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding to subordinate conspecific intruders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (12), 4870–4875.
- Motta, S.C., Carobrez, A.P., Canteras, N.S., 2017. The periaqueductal gray and primal emotional processing critical to influence complex defensive responses. *Fear Learn. Reward Seek.* 76 (Pt A), 39–47.
- Nathanson, J.L., Yanagawa, Y., Obara, K., Callaway, E.M., 2009. Preferential labeling of inhibitory and excitatory cortical neurons by endogenous tropin of AAV and lentiviral vectors. *Neuroscience* 161 (2), 441–450.
- Salasba, C., Dempsey, B., Le, S., Goodchild, A., McMullan, S., 2019. A student's guide to neural circuit tracing. *Front. Neurosci.* 13, 897.
- Salegio, E.A., Samaranch, L., Kells, A.P., Mittermeyer, G., Sebastian, W.S., Zhou, S., Beyer, J., Forsythe, J., Bankiewicz, K.S., 2013. Axonal transport of adeno-associated viral vectors is serotype-dependent. *Gene Ther.* 20 (3), 348–352.
- Silva, B.A., Mattucci, C., Kryzwickowski, P., Munna, E., Ilarionov, A., Grinevich, V., Canteras, N.S., Ragozzino, D., Gross, C.T., 2013. Independent hypothalamic circuits for social and predator fear. *Nat. Neurosci.* 16 (12), 1731–1733.
- Sun, L., Tang, Y., Yan, K., Yu, J., Zou, Y., Xu, W., Xiao, K., Zhang, Z., Ji, W., Wu, B., Hu, Z., Chen, K., Fu, Z.F., Dai, J., Cao, G., 2019. Differences in neurotropism and neurotoxicity among retrograde viral tracers. *Mol. Neurodegener.* 14 (1), 8.
- Swanson, L.W., 2000. Cerebral hemisphere regulation of motivated behaviour. *Brain Res.* 886 (1–2), 113–164.
- Tervo, D.G., Hwang, B.Y., Vinwanathan, S., Gaj, T., Lawlin, M., Ritola, K.D., Hndo, S., Michad, S., Kuleshova, E., Ojala, D., Huang, C.C., Gefen, C.R., Schiller, J., Dudman, J.T., Hantman, A.W., Looger, L.L., Schaffer, D.V., Kapova, A.Y., 2016. A designer AAV variant permits efficient retrograde access to projection neurons. *Neuron* 92 (2), 372–382.
- Wang, L., Chen, L.Z., Liu, D., 2015. Collateral pathways from the ventromedial hypothalamus mediate defensive behaviors. *Neuron* 85 (6), 1344–1358.
- Wang, L., Talwar, V., Osakada, T., Kuang, A., Guo, Z., Yamaguchi, T., Liu, D., 2019. Hypothalamic control of conspecific self-defense. *Cell Rep.* 26 (7), 1747–1758 e5.
- Wang, W., Schuette, P.J., Ia-Vu, M.Q., Torossian, A., Tobias, B.C., Geko, M., Krugel, P.A., Reis, F.M., Ji, S., Sehgal, M., Maesta-Pereira, S., Chakerian, M., Silva, A.J., Canteras, N.S., Wager, T., Kao, J.C., Adhikari, A., 2021a. Dorsal preanterior nucleus projection to periaqueductal gray controls escape vigor from innate and conditioned threats. *Elife* 10, e69178.
- Wang, W., Schuette, P.J., Nagai, J., Tobias, B.C., Caccovia, V., Reis, F.M., Ji, S., de Lima, M.A.X., Ia-Vu, M.Q., Maesta-Pereira, S., Chakerian, M., Leonard, S.J., Lin, L., Severino, A.L., Cahill, C.M., Canteras, N.S., Khakh, B.S., Kao, J.C., Adhikari, A., 2021b. Coordination of escape and spatial navigation circuits orchestrates versatile flight from threats. *Neuron* 109 (11), 1848–1860 e8.

Figura 106: Página 6 da publicação Failure of AAV retrograde tracer transduction in hypothalamic projections to the periaqueductal gray matter. [la105]