UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA
Laboratório de Neuroanatomia Funcional

PEDRO LEONARDO CEDRAZ MERCEZ

**Papel funcional do Colículo Superior
nos comportamentos motivados de ratos.**

Ribeirão Preto/SP

2010

PEDRO LEONARDO CEDRAZ MERCEZ

**Papel funcional do Colículo Superior
nos comportamentos motivados de ratos.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de mestre em Ciências (Área de
concentração: Fisiologia)

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Comoli

Ribeirão Preto/SP

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

MERCEZ, Pedro Leonardo Cedraz

Papel funcional do Colículo Superior nos comportamentos motivados de ratos.

Ribeirão Preto/SP, 2010.

78p. 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Comoli, Eliane.

1. Colículo Superior 2. Comportamento Defensivo 3. Comportamentos predatório 4. Muscimol.

Nome: Mercez, Pedro Leonardo Cedraz

Título: Papel funcional do Colículo Superior nos comportamentos motivados de ratos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de mestre em fisiologia.

Aprovado em:

Banca examinadora.

Profa Dra Eliane Comoli

Instituição _____

Julgamento _____

Assinatura _____

Prof. Dr. José Marino-Neto

Instituição _____

Julgamento _____

Assinatura _____

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Instituição _____

Julgamento _____

Assinatura _____

AGRADECIMENTOS

À orientadora da presente dissertação, Profa. Dra. Eliane Comoli.

À comissão julgadora desta dissertação.

À coordenação e ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

ABREVIATÖES¹

AQ: aqueduto
CS: colículo superior
CSl: colículo superior, porção lateral
CSm: colículo superior, porção medial
fx: fórnix
MG: complexo geniculado medial
PAG: substância cinzenta periaquedutal
PMd: núcleo pré-mamilar dorsal
RxB: rato exposto as baratas
RxG: rato exposto ao gato
RxGxB: rato exposto as baratas e ao predador natural ao mesmo tempo
RjxGxB1: ratos que desempenharam o comportamento predatório ao serem expostos as baratas e ao predador natural ao mesmo tempo, após restrição alimentar
RjxGxB2: ratos que desempenharam o comportamento defensivo ao serem expostos as baratas e ao predador natural ao mesmo tempo, após restrição alimentar
SAI: stratum album intermediale do colículo superior
SAP: stratum album profundum do colículo superior
SCl: colículo superior, porção lateral
SCm: colículo superior, porção medial
SGI: stratum griseum intermediale do colículo superior
SGP: stratum griseum profundum do colículo superior
SGS: stratum griseum superficiale do colículo superior
SO: stratum opticum do colículo superior

¹ As abreviações foram extraídas do “Brain Maps: Structure of the Rat Brain”, Swanson, L.W (2004), 3rd Edition; para o colículo superior sugerimos May, P.J. (2006)

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	0	Erro! Indicador não definido.
1.1.	Comportamento Predatório	0	Erro! Indicador não definido.
1.2.	Comportamento Defensivo		03
1.3.	O Colículo Superior e sua importância na integração da informação sensorial e motora nos comportamentos motivados		04
2.	OBJETIVOS		11
2.1.	Objetivos gerais		11
2.2.	Objetivos específicos		Erro! Indicador não definido.1
3.	METODOLOGIA		12
3.1.	Animais		12
3.2.	Gaiola Experimental utilizada nos estudos comportamentais		15
3.3.	Seleção Comportamental dos ratos utilizados em nossos experimentos		18
3.4.	Habituação às condições experimentais e ao experimentador		18
3.5.	Experimentos Comportamentais		20
	3.5.1. Experimento 1: Teste Comportamental de ratos expostos conjuntamente às baratas e ao gato		20
	3.5.2. Experimento 2: Experimentos Comportamentais envolvendo manipulações farmacológicas no Colículo Superior		21
	3.5.2.1. Cirurgia Estereotáxica		21
	3.5.2.2. Injeção do agonista GABAérgico muscimol no CSm		26
	3.5.2.3. Teste comportamental dos ratos canulados no CSm e expostos às baratas e ao gato		27
	3.5.3. Experimento 3: Teste Comportamenal de ratos expostos às baratas e ao gato, após privação alimentar		29
3.6.	Perfusão e histologia.		30
3.7.	Deteção Imunohistoquímica da proteína Fos em encéfalo de ratos usados em nossos experimentos comportamentais		33
3.8.	Análise Comportamental		35
3.9.	Análise do número de células imunorreativas à proteína Fos		36
3.10.	Análise Estatística		38
4.	RESULTADOS		39
4.1.	Experimento 1		39
4.2.	Experimento 2		43
4.3.	Experimento 3		45
5.	DISCUSSÃO		57
5.1.	Considerações metodológicas o uso da proteína Fos como marcador de atividade neuronal		57
5.2.	Considerações metodológicas dos experimentos envolvendo manipulações farmacológicas		59
5.3.	Papel do CS nos comportamentos motivados de resposta defensiva e predatória		61
6.	CONCLUSÃO		71
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		72

RESUMO

O colículo superior (CS) é conhecido por ser responsável pela detecção e orientação da cabeça e olhos em direção a estímulos visuais. Ainda o CS funciona na detecção e guia de respostas iniciais a objetos inesperados no campo visual e orientação da cabeça no sentido de estímulos apetitivos ou afastamento de estímulos potencialmente ameaçadores. Estudos prévios mostraram que a predação de insetos está associada à expressão da proteína Fos nas porções laterais do colículo superior (CSl) e ratos com lesões bilaterais de NMDA na região do CSl tipicamente falham em orientarem-se e caçarem insetos usando a sequência de movimentos estereotipados comumente vistos na caça predatória de insetos.

Parece que as porções mediais do colículo superior (CSm) está envolvida com a organização de respostas defensivas, uma vez que estimulações nesse sítio elicia respostas de esquiva adicionadas de ajustes viscerais relacionados as respostas defensivas. Interessantemente, um aumento de imunorreatividade à proteína Fos foi observada no CSm enquanto ratos foram expostos ao predador natural (Comoli and Cedraz-Mercez, 2009).

Um estudo sistemático com o rastreador neuronal FluoroGold realizado no nosso laboratório mostrou diferenças no padrão de conexões aferentes sugerindo que o CSm recebe informações principalmente de vários setores do córtex associativo que refletem uma maior integração de informações cognitivas referentes ao predador e do circuito hipotalâmico relacionado com a defesa, enquanto o CSl integra informações principalmente relacionadas ao sistema somatossensorial das vibrissas e da região orofacial que sabidamente são muito importantes para o comportamento de aproximação. Essas diferenças anatômicas podem ser importantes para influenciar o CS na modulação de respostas comportamentais aos estímulos relevantes biologicamente.

Baseado no exposto acima sugerimos que haja uma distinção funcional entre o CSm e CSI de ratos.

Nossos resultados mostraram que 100% dos ratos expostos ao predador natural ou as baratas e ao predador ao mesmo tempo desempenharam respostas de defesa e tiveram aumento da proteína Fos no CSm. A inativação do CSm com muscimol mostrou um aumento de comportamento exploratório e redução da resposta de congelamento motor quando esses animais foram expostos as baratas e ao predador natural ao mesmo tempo. Interessantemente na situação em que o rato encontra-se fisicamente ameaçado pela presença do predador e também fisiologicamente ameaçado por um déficit nutricional elevado (devido à privação alimentar) e defronta-se com presas observamos que 50% desses animais desempenham respostas defensivas e apresentam aumento da proteína Fos no CSm e setores do circuito de defesa; e 50% dos animais desempenham respostas predatórias e apresentam aumento de proteína Fos no CSI e pouca atividade no circuito de defesa.

Sugerimos que o CSm é um sítio muito importante na integração de informações referentes à atenção voltada ao predador e que deve exercer um papel no processo de seleção comportamental ao nível dos gânglios da base. Ainda sugerimos que existe uma interação importante entre os sistema colicular e o sistema hipotalâmico de defesa.

ABSTRACT

The Superior Colliculus (SC) is well known to be responsible for detecting and orienting the head and eyes toward visual stimuli. Moreover SC works in the detection and guidance of initial responses to unexpected objects in the visual field, in addition to the orienting the head towards appetitive and away from potentially threatening stimuli. Previous studies have shown that insect predation in rats is associated with the expression of Fos protein at the lateral part of intermediate layer of Superior Colliculus (SCL) and rats with local bilateral NMDA lesions in the SCL typically fail to orient towards and chase the roaches with the series of stereotyped movements commonly seen in the predatory hunting of intact controls.

It seems that the medial region of Superior Colliculus (SCM) is involved in the organization of defensive behavior once stimulation in this site elicits avoidance responses in addition to visceral adjustments related to defensive responses. Interestingly, an increase of Fos immunoreactivity was found in the medial region of SC (SCM) while rats were exposed to the cat (Comoli and Cedraz-Merchez, 2009).

A systematic study with the retrograde tracer FluoroGold conducted in our laboratory showed the differences in the pattern of afferent connections suggesting that SCM mostly integrates inputs coming from associative cortical areas and key sites of the defensive circuitry while SCL integrates inputs from whiskers and orofacial-related somatosensory information which is important for approaching behaviors. These anatomical differences might be very important to influence SC in modulating behavioral responses to biologically relevant stimuli.

Based on the mentioned above we propose that SCM and SCL could be functionally distinct.

Our results showed that rats exposed to the natural predator or exposed to the roaches and the natural predator together performed fear responses and Fos upregulation at the SCm. Muscimol inactivation of SCm showed an increase of exploratory behaviors and reduction of freezing responses when the animals were exposed to both the roaches and the predator together. In a challenging experiment rats were food deprived and were exposed to both, the roaches and the natural predator and Fos protein was detected. Fifty percent of the rats showed predatory behavior and did not show the fear responses commonly seen when exposed to the natural predator. Moreover an increase of Fos protein levels was observed at the SCl of these rats. The other fifty percent of the rats showed fear responses and did not hunt the preys. In contrast an increase of Fos protein was detected at SCm and at the hypothalamic defensive circuitry of these rats.

We suggest that SCm is very important for integration of information concerning the predator and might influence the behavioral selection process at the level of basal ganglia. We also suggest there is a relation between collicular and hypothalamic defensive circuits.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Comportamento Predatório.

A agressão predatória é uma das grandes classes do comportamento agressivo (Moyer, 1968). À época deste trabalho, o conhecimento acerca das bases fisiológicas do comportamento predatório era bastante restrito, mas em sua revisão Moyer fornece algumas diretrizes para a caracterização comportamental da predação e a distinção entre esta e as demais formas de agressividade. Segundo Moyer, a predação é direcionada a uma presa específica e normalmente não acompanhada por respostas autonômicas muito marcantes. Pode ser diferenciada de outros comportamentos agressivos com base nos padrões motores emitidos pelo animal atacante, e pela especificidade da situação-estímulo que a elicia. É um comportamento evocado pela presença de um objeto-presa natural, sendo que o deslocamento deste parece aumentar a probabilidade do ataque.

O comportamento predatório é uma resposta inata crítica para a sobrevivência do animal, que se encontra filogeneticamente preservado entre os mamíferos, e que obedece a um curso de evolução no desenvolvimento das técnicas de captura e sacrifício da presa (Eisenberg e Leyhausen, 1972). Como exemplo disto, o estudo de Leyhausen (1965) que avaliou o comportamento predatório de membros de diferentes gêneros de uma mesma família de mamíferos, concluiu que o uso da boca precedeu o uso dos membros dianteiros na captura das presas, assumindo a ocorrência de uma recente evolução na técnica predatória entre os membros desta família. O padrão comportamental predatório desempenhado por ratos são similares àqueles apresentados por pequenos insetívoros (Eisenberg e Leyhausen, 1972). Assim como os insetívoros, o rato utiliza a boca como órgão primário para capturar e matar suas presas. No entanto, diferentemente dos insetívoros que utilizam exclusivamente a boca, a capacidade de manipular a presa utilizando os membros anteriores é de extrema

importância para os ratos, seja no momento da ingestão ou em situações na qual as presas escapam, onde o predador tentará retomar a captura e contenção da presa.

A motivação presente no comportamento predatório é influenciada tanto pelo caráter lúdico da captura das presas, quanto pelo valor energético da recompensa obtida pela execução da predação, já que insetos como as baratas, que possuem agilidade e estratégias de fuga, representam um desafio para os roedores durante a captura, além de se constituírem como uma fonte rica em proteínas e abundante em seu habitat (Negrão e Schmidek, 1987). Portanto, se estabelece uma dificuldade para dissociar estes dois componentes do comportamento predatório, tendo em vista que a predação é executada tanto por animais alimentados, quanto por animais privados de alimento (observações do nosso laboratório).

A caracterização das áreas do Sistema Nervoso Central envolvidas na predação foi feita por imunodeteção da proteína Fos, onde foi observado uma supregulação da imunorreatividade à Fos em sítios prosencefálicos que foram relacionados à organização da seqüência de ações estereotipadas observada na predação, assim como ao valor motivacional relacionado à presa (Comoli *et al.*, 2005). Em estudos anteriores, Comoli e Canteras (1998; 2000) relataram um aumento da expressão da proteína Fos na porção lateral das camadas intermediárias do colículo superior (CSl) de animais que haviam executado o comportamento de predação insetos, mas não naqueles que expressaram o comportamento alimentar, e outros comportamentos observados no laboratório, tais como nado forçado, choque nas patas, contenção, etc (Comoli, observações pessoais).

Estes dados corroboram com a idéia de que a movimentação da presa e seu contato com as vibrissas seriam estímulos biologicamente importantes para a predação tendo em vista que o CS é uma estrutura envolvida em movimentos de orientação guiados sensorialmente (Dean *et al.*, 1989; Waleszczyk *et al.*, 2004).

1.2. Comportamento defensivo.

De mesma importância, a resposta de defesa se apresenta também como um comportamento filogeneticamente preservado, inato e que apresenta um mesmo padrão de resposta em todos os indivíduos de uma mesma espécie, sendo importante para a manutenção do indivíduo e da espécie no ambiente.

A resposta inata dos roedores a uma ameaça ambiental, como a presença de um predador natural, é caracterizada por respostas comportamentais, tais como: congelamento motor, escape, avaliação de risco, defecação, micção, exoftalmia, assim como analgesia e descarga simpática generalizada (Blanchard, D.C e Blanchard, R.J., 1971; Blanchard, D.C, 1997), as quais são coordenadas por sítios neurais específicos da zona medial do hipotálamo (Canteras et al., 1997, 2001; Canteras, 2002), os quais apresentam fortes relações com setores amigdalianos e hipocampais relacionados com o processamento de informações do predador e do seu odor (Blanchard *et al.*, 2005). Essas respostas comportamentais são expressas de forma semelhante em todas as espécies de mamíferos (Blanchard *et al.*, 2001).

A relação presa-predador entre roedores e gatos, que foi estabelecida durante a evolução destas espécies, selecionou os indivíduos que desenvolveram maior sensibilidade aos estímulos sensoriais provenientes de seu predador, e que foram capazes de elaborar estratégias comportamentais eficientes para a defesa e, portanto para uma melhor adaptação ao meio. Nos mamíferos macrosmáticos, como as espécies de roedores de laboratório, a olfação se apresenta como a principal modalidade sensorial para a detecção e possivelmente identificação do predador utilizando como as principais fontes de odor a pele, a urina, as fezes e as secreções de glândulas anais dos predadores (Apfelbach *et al.*, 2005).

Estudos laboratoriais que expõem ratos ao seu predador ou ao seu odor demonstraram que tal condição é capaz de gerar uma redução, significativa e por período prolongado, na ocorrência de qualquer atividade locomotora e/ou comportamento não

relacionado à resposta de defesa nestes animais (Blanchard e Blanchard, 1989a, 1989b; Dielenberg e McGregor, 2001; McGregor *et al.*, 2002; Hubbard *et al.*, 2004).

Complementarmente uma série de estudos neuroanatômicos envolvendo comportamento e associados a lesões neurais tem contribuído enormemente com a compreensão da organização da circuitaria neural responsável pelo comportamento defensivo em ratos (Canteras, et al., 1997; Comoli et al, 2000, Canteras et al, 2001; Canteras, 2002; Comoli et al., 2003).

1.3. O Colículo Superior e sua importância na integração da informação sensorial e motora nos comportamentos motivados.

Para explorar o mundo que os cerca, os animais são capazes de orquestrar movimentos de diversos efetores, tais como olhos, cabeças e tronco, para se orientar em direção às características interessantes que possam surgir no ambiente. Este tipo de resposta de orientação é um exemplo de mecanismo neural que permite que a aquisição das informações provenientes do ambiente seja adequadamente utilizada por sistemas motores para produzir comportamentos adaptativos. O Colículo Superior, uma estrutura do mesencéfalo de mamíferos, tem sido objeto de estudo durante décadas, em função da proximidade e da interação entre neurônios sensoriais que codificam o *loci* espacial do estímulo externo e neurônios premotores envolvidos na execução dos movimentos de cabeça e olhos. Desta maneira, dentro de uma única estrutura é possível estudar os mecanismos envolvidos na tradução de sinais sensoriais em comandos motores adaptativos.

Há uma surpreendente similaridade na organização sensorial e motora do Colículo Superior (CS) entre os mamíferos, sugerindo que este esquema de organização pode ter surgido antes do aparecimento dos mamíferos recentes.

Estudos executados por Barry E. Stein (Gather e Stein, 1979; Stein, 1981) revelaram que o CS de mamíferos e o teto óptico de répteis são estruturas homólogas, e que o padrão topográfico encontrado representa um plano de representação sensorial que existiu nos antigos répteis e que foi retido durante a evolução para os mamíferos há mais de 180 milhões de anos.

O CS é uma estrutura localizada bilateralmente na superfície dorsal do mesencéfalo, sendo organizada em camadas celulares e fibrosas alternadas, as quais são orientadas horizontalmente. O CS é limitado rostralmente pela área pré-tectal, ventralmente pela substância cinzenta periaquedutal (PAG) e caudalmente pelo colículo inferior.

Sua divisão anatômica compreende sete camadas: camada zonal ou *stratum zonale* (SZ), cinzenta superficial ou *stratum griseum superficiale* (SGS), óptica ou *stratum opticum* (SO), cinzenta intermediária ou *stratum griseum intermediale* (SGI), branca intermediária ou *stratum album intermediale* (SAI), cinzenta profunda ou *stratum griseum profundum* (SGP) e branca profunda ou *stratum album profundum* (SAP) (Figura 1).

As camadas SZ, SGS e SO são as camadas superficiais do SC, e estão envolvidas primariamente no processamento de informações visuais (May, 2006), uma vez que recebem projeções diretas provenientes das células ganglionares da retina, projeções que são topograficamente organizadas; projeções provenientes do córtex visual, núcleo geniculado lateral e área pré-tectal. As camadas SGI, SAI, SGP e SAP são conjuntamente denominadas camadas profundas do SC. Em contraste com o observado nas camadas superficiais, as camadas profundas recebem numerosos impulsos de diversas modalidades sensoriais e não-sensoriais, assim como impulsos provenientes de estruturas motoras do encéfalo (Dean *et al.*, 1989). Assim dá-se uma distinção funcional entre as camadas superficiais e camadas profundas.

Figura 1 - Corte frontal do colículo superior direito de um rato em preparação de coloração de Nissl (Direita) e diagrama esquemático evidenciando sua organização laminar (Esquerda). Abreviações: PAG: substância cinzenta periaquedutal; SP: stratum profundum; SGI: stratum griseum intermediale; SGP: stratum griseum profundum; SGS: stratum griseum superficiale; SO: stratum opticum. Adaptado de Coizet et al. 2007.

O Colículo Superior é conhecido por ser responsável por detecção e orientação da cabeça e olhos em direção a estímulos visuais (Grantyn, 1988; Munoz and Guitton, 1989; Wurtz, 1996; Sparks, 1999, Boehnke and Munoz, 2008).

No caso de roedores o CS também é importante para posicionamento da cabeça no espaço durante uma variedade de tarefas orais, tais como predação, forrageamento por comida e respostas nocifensivas direcionadas a dores localizadas (Redgrave et al., 1980; Welzl et al., 1984; Steiner and Huston, 1992; Wang and Redgrave, 1997; Ewert et al., 1999). Também está envolvido com mudança de fixação do olhar direcionada a pistas auditivas, somatossensoriais e olfativas (Grobstein, 1988; Dean et al., 1989; King, 2004; Boehnke and Munoz, 2008; Felsen and Mainen, 2008). Ainda, o CS é crítico para detecção e guia de respostas iniciais a objetos inesperados no campo visual (Grantyn, 1988; Munoz and Guitton, 1989; Wurtz, 1996; Sparks, 1999; Coizet, et al. 2003; Comoli et al, 2003), e orientação da cabeça opostamente a estímulos potencialmente ameaçadores (Dean et al., 1989; Brandão et al., 1994; Brandão et al., 1999).

Ainda mais, algumas células são multimodais, ou seja, são capazes de responder a estímulos de duas ou mais modalidades sensoriais (Vidyasagar, 1978).

A partir de análises de dados comportamentais e imunohistológicas, Comoli e Canteras (1998) observaram que os animais que haviam caçado e consumido insetos, demonstraram elevada imunorreatividade à Fos nas células da porção lateral da camada intermediária do CS (CSl), e que lesões bilaterais neste sítio foram associadas à ocorrência de movimentos dispráxicos na região orofacial e nos membros anteriores, e ao comprometimento na orientação dos animais em direção às presas em deslocamento no seu campo visual (Comoli e Canteras, 2000; Furigo, et al., 2010). Estes animais não eram capazes de abocanhar nem apanhar efetivamente as presas. Diante disso as baratas escapavam com facilidade e o rato fracassava em abatê-las.

Estudos em gatos corroboram a idéia de que o deslocamento da presa e mesmo o contacto das vibrissas parecem ser estímulos fundamentais para desencadear o comportamento predatório, uma vez que experimentos eletrofisiológicos mostram que neurônios localizados nas camadas profundas e intermediárias do CS disparam na presença de objetos que se deslocam no campo visual (Dean e Redgrave, 1984a, 1984b, 1984c). Ainda não há evidência de registros eletrofisiológicos em ratos relacionando a sensibilidade das células da CSl ao deslocamento de objetos no campo visual, porém sabe-se que essas células tectais apresentam alterações eletrofisiológicas mediante estímulos táteis aplicados na face e nas vibrissas e parecem fazer parte de um sistema diferentemente responsivo a estímulo somático da região perioral e que pode ser usado para guiar objetos para a boca (Dean et al., 1989); e que lesões na região do CS comprometeram a orientação destes animais a partir de estímulos multisensoriais (Burnett et al., 2004).

Considerando nossas observações prévias, o movimento da presa, em particular o seu contacto com as vibrissas dos ratos parece ser um estímulo crítico responsável por evocar a caça e aumentar a expressão de Fos no CSl. Dados anatômicos e eletrofisiológicos mostram que o CSl recebe informações somatossensoriais relacionadas com as vibrissas e regiões

orofaciais de diversas fontes incluindo os núcleos trigeminais espinhal (SpV) e principal (PrV) (Killackey e Erzurumlu, 1981; Huerta et al., 1983; Comoli and Canteras, 2000; Hemelt e Keller, 2007), zona incerta (ZI) (Kolmac et al., 1998; Comoli e Canteras, 2000), núcleo reticular parvicelular (PARN) e córtex somatosensorial (SSp) (Comoli e Canteras, 2000; Cohen et al., 2008; Comoli e Canteras, 2000; Comoli e Favaro, 2009). O CSI também recebe informações viscerais, através da área parabraquial, e possivelmente olfativas, através do campo retrorubral (Comoli e Canteras, 2000; Comoli e Favaro, 2009). Comoli e Canteras (2000) sugerem que o CSI pode exercer controle direto sobre movimentos oculares, orofaciais e dos membros dianteiros através de projeções descendentes; e ainda modular a resposta motora comportamental via influências de projeções ascendentes sobre o circuito dos gânglios da base e cerebelo (Comoli e Canteras, 2000; Furigo et al., 2010).

Ainda estudos recentes do nosso laboratório (Comoli e Gouvea, 2009) relatam a importância do CSI na integração somatossensorial das vibrissas na execução de ataques precisos efetivos durante a resposta predatória.

Com base em todos esses dados sugere-se que o CSI seja uma estrutura chave na integração sensório-motora durante o comportamento predatório em ratos.

Em roedores, uma outra distinção funcional pode ocorrer entre os setores mediais (campo visual superior) e laterais (campo visual inferior) (Dean *et al.*, 1989). Uma vez que nesses animais a maior parte dos estímulos ameaçadores surge de cima, a porção medial do CS parece ser especializada para defesa, enquanto estímulos provenientes do campo visual inferior tipicamente eliciam comportamento apetitivo e de aproximação (Dean *et al.*, 1988; Dean e Redgrave, 1991). O CS participa no comportamento defensivo em ratos e no reconhecimento de expressões amedrontadoras em humanos (Schenberg *et al.*, 2005); e suas porções mediais (CSm) apresentam-se ativas durante o comportamento de defesa na presença do predador (observação do nosso laboratório).

Estimulações químicas ou elétricas na região do SCm de ratos produzem respostas defensivas, dentre elas congelamento motor, analgesia, ativação do EEG, micção, defecação e alterações cardiovasculares como aumento da pressão sanguínea e do ritmo cardíaco (Redgrave e Dean, 1985; Dean *et al.*, 1988; Keay *et al.*, 1990; Vargas *et al.*, 2000).

Dados do nosso laboratório (Comoli e Favaro, 2009) sugerem que o CSm integra predominantemente informações auditivas e visuais provenientes de diversas áreas corticais e subcorticais, assim como informações de estruturas-chave para organização de respostas defensivas como o circuito de defesa no hipotálamo medial e a porção dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal.

Diferentemente, em animais que predaram as baratas, as porções laterais do CS (CSl) se apresentam ativas. As vias de saída das porções mediais e laterais do CS fazem contactos, preferencialmente com núcleos pré-motores do tronco encefálico (Yasui *et al.*, 1994; 1995; Shammah-Lagnado *et al.*, 1999; Holstege *et al.*, 1977; Jüch e Rokx, 1988; Li *et al.*, 1995; Mogoseanu *et al.*, 1993; Dobbins e Feldman 1995) responsáveis por direcionar o animal no sentido de estímulos salientes inesperados ou desviá-lo, respectivamente (Redgrave *et al.*, 1986; 1987; 1993).

Assim os dados anatômicos dão suporte à idéia da existência de uma possível segregação funcional do CS.

Na tentativa de avaliar o papel do CS no processo de seleção comportamental realizamos experimentos em que os ratos foram expostos simultaneamente as presas e ao predador natural.

Em seguida, realizamos experimentos de manipulações farmacológicas no CSm; e simultaneamente observamos o comportamento destes animais quando expostos a baratas e ao predador natural. Acreditávamos que a inativação do CSm traria grandes efeitos na

resposta do rato na presença do predador e das presas, e com isso testaríamos a hipótese de que o CSm esta funcionalmente envolvido na resposta defensiva e possivelmente envolvido no processo da seleção comportamental ao nível dos núcleos da base. Evidenciamos a importância do CS no processamento atencional referente ao predador.

Por fim, pensamos em outra situação comportamental bastante crítica que provavelmente nos permitisse interpretações adicionais sobre o papel do CSm em processamento atencional. Assim avaliamos a resposta comportamental de ratos numa situação mais crítica envolvendo ao mesmo tempo a ameaça de sobrevivência frente ao predador natural e também frente a necessidades fisiológicas críticas provocadas pelo deficit de nutrientes após restrição alimentar de 72 horas; quando foram expostos ao predador e as presas.

Nossos experimentos contribuem com informações importantes para uma melhor compreensão a respeito do envolvimento do CS nas respostas defensiva e predatória em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

A proposta do presente trabalho foi avaliar a possível existência de uma segregação funcional no Colículo Superior de ratos.

2.2. Objetivos Específicos

Para alcançar os objetivos gerais, os objetivos específicos desse trabalho foram:

- 1) Avaliar a resposta comportamental e comparar o padrão de distribuição da proteína Fos no Colículo Superior de ratos expostos ao predador natural, ratos expostos as baratas e ratos expostos a ambos simultaneamente.
- 2) Verificar o efeito da inativação das porções mediais do Colículo Superior pela microinjeção de muscimol sob a resposta comportamental de ratos expostos as baratas e ao predador natural simultaneamente.
- 3) Avaliar a resposta comportamental e o padrão de distribuição da proteína Fos no Colículo Superior e setores hipotalâmicos de ratos privados de alimento quando foram expostos as baratas e ao predador natural.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

3.1.1. *Rattus norvegicus* - Por que utilizar o *Rattus norvegicus* como animal modelo para a pesquisa estudo em ciências biológicas?

O uso extensivo do rato como animal de laboratório destinado à pesquisa científica é devido ao fato da espécie reunir diversas qualidades adequadas a tal prática. Dentre estas qualidades podemos destacar o requerimento de pequenos espaços, dieta onívora, exigência de manejos simples, curto período entre gerações, proles numerosas e a susceptibilidade à padronização (Farris e Griffith, 1963). Esta susceptibilidade foi confirmada por Milton Greenman, do Instituto Wistar, que ao aplicar conceitos básicos de gerenciamento aos métodos de manejo e cuidados dos animais, permitiu a inserção na prática científica, dos ideais da uniformidade do produto, de padrões de qualidade e eficiência na produção, gerando um modelo animal padrão que hoje pode ser encontrado em laboratórios de todo o mundo (Clause, 1993). Sendo assim, a difusão na utilização do rato, permitiu e ainda permite que os pesquisadores comparem seus resultados com aqueles resultados gerados anteriormente ou com os de pesquisas atuais produzidos em outros laboratórios (Farris e Griffith, 1963). Em complementação, os objetivos deste estudo estão alicerçados em resultados de estudos anteriores sobre o cóliculo superior e que utilizaram ratos como modelo experimental (Sahibzada et al., 1986; Redgrave et al., 1987; Dean et al., 1989). A partir destas informações, justificamos a utilização do rato albino (*Rattus norvegicus*) como animal experimental utilizado em nosso projeto.

Ratos albinos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Wistar, foram adquiridos comercialmente do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, campi Ribeirão Preto. Os ratos com peso entre 200-250 g foram transportados ao Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina - USP, campi Ribeirão Preto, onde os mesmos foram

coletivamente locados em gaiolas, sob ciclo claro/escuro: 12/12 h, a uma intensidade luminosa de 126 a 127 x 1 LUX, intensidade sonora de 55.7 a 58.5 dB, umidade de 68.5 ± 0.1508%, e a uma temperatura de 23 ± 2 °C. O assoalho destas gaiolas foi revestido internamente com maravalha de pinus, evitando o contato direto dos animais com o piso. Este revestimento torna-se útil também como substrato para absorção da água, incorporação das fezes e contribui para a redução das oscilações de temperatura no local de abrigo. Ração padrão em *pellets*, destinada à alimentação de roedores de laboratório (Nuvital® - NUVILAB), e água foram disponibilizadas *ad libitum*.

3.1.2. Gato doméstico (*Felis cattus*) - Por que utilizar o gato doméstico como modelo de predador do rato?

Um questionamento comum feito por qualquer um que tenha a oportunidade de observar as respostas de defesa e as alterações de parâmetros fisiológicos eliciadas por ratos albinos quando estes se encontram diante de um gato é como estes animais, que mesmo por centenas de gerações sendo mantidos confinados ao ambiente do laboratório, são capazes de executar respostas de defesa diante de um predador sem que tenha havido qualquer contato prévio com um gato que possibilitasse a elaboração de uma resposta comportamental adequada e o seu aprendizado? Primeiramente, as respostas inatas eliciadas pelo rato diante do gato sugerem que os mecanismos neurais envolvidos no reconhecimento de um potencial predador são geneticamente determinados, e que foram preservados por apresentarem uma forte vantagem seletiva (Papas et al., 2010). Sistemáticamente, esta predeterminação genética se confirma através dos resultados de estudos sistemáticos e de estudos que utilizam lesões em sítios encefálicos específicos que compõem o conjunto de estruturas de um circuito responsável por eliciar um repertório de comportamentos de defesa quando o rato encontra-se diante do gato (Canteras e Swanson, 1992; Canteras et al., 1997; Blanchard et al., 2003; Canteras et al., 2008), e que foi preservado durante o processo de seleção e de domesticação

do *Rattus norvegicus*. Em complementação, este processo de seleção pode ter se iniciado a partir da relação comensal criada entre o rato, o gato e o homem, a cerca de 9000 anos na região do Fertil Crescente, onde a domesticação de grãos (Tanno e Willcox, 2006) e do gado permitiu não só a fixação do homem, assim como atraiu também roedores e felinos selvagens. Provavelmente, foi neste cenário que ratos foram selecionados e felinos domesticados (Driscoll et al., 2007), permitindo que hoje tenhamos o *Rattus norvegicus* apresentando um elaborado repertório de respostas de defesa quando diante de seu predador, o gato doméstico, que ainda hoje apresenta um papel importante em determinar a estrutura da população de roedores em ambientes urbanos (Glass et al., 2009).

O gato doméstico (*Felis cattus*), utilizado como modelo de predador natural do rato, foi obtido do Biotério Geral da USP, campi de Ribeirão Preto, onde se encontra locado e sob os devidos cuidados.

3.1.3 Baratas (*Nauphoeta cinerea*) - Por que utilizar a barata como modelo de presa do rato?

As baratas foram escolhidas como uma presa apropriada por serem inócuas, facilmente manipuláveis, não induzirem respostas defensivas e serem bem recebidas como presas por ratos de diferentes linhagens (Rebouças e Schmidek, 1997).

As baratas do gênero *Nauphoeta cinerea*, utilizadas como presas do rato foram criadas e mantidas em um baratário, sob condições adequadas, pelo Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina - USP, campi Ribeirão Preto, em recinto distinto daqueles onde os ratos são encontrados. O baratário consiste numa caixa plástica (Martinite, mod. 1018 com dimensões de 89.0 comp x 48.5 larg x 56.0 alt cm e capacidade de 195 Litros), com tampa telada. Água (através de algodão umedecido) e alimento (ração animal) foram disponibilizados em três recipientes que permitiam o livre acesso às baratas. Placas de papelão, como aquelas utilizadas na comercialização de ovos, foram disponibilizadas com o objetivo de fornecer um ambiente adequado aos insetos. Diariamente, foi monitorada a

disponibilidade de água e alimento para as baratas, assim como, mensalmente o baratário foi submetido à higienização completa, na qual a caixa era lavada, e as baratas mortas assim como os excrementos destas, eram removidos.

Para evitar que os insetos escapassem do interior do baratário durante a manipulação, foi aplicada uma camada de dez centímetros de vaselina sólida na borda interna do baratário, onde mensalmente essa aplicação era renovada.

A coleta dos insetos, para a utilização nos experimentos comportamentais, foi realizada com o auxílio de um tubo de papelão que era colocado no fundo da gaiola, e em seguida os insetos presentes no interior deste tubo eram transferidos para uma caixa plástica e conduzidos ao laboratório onde foram colocados no aplicador de presas. Este procedimento teve por objetivo preservar a estrutura física do inseto durante a sua coleta, e evitar qualquer prejuízo para análise do comportamento, tendo em vista que durante a predação foi observado que os ratos buscavam presas que tinham uma maior velocidade de deslocamento no interior da gaiola.

A aprovação da utilização das espécies supramencionadas para fins de estudo e pesquisa se deu através do Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 131/2007 emitido pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em 25 de Fevereiro de 2008.

3.2. Gaiola experimental utilizada nos estudos comportamentais.

A gaiola de comportamento foi idealizada para permitir que o rato tivesse contato físico com suas presas, mas não com o seu predador natural, sendo esta confeccionada com acrílico transparente e acrílico branco (Figura 2), e apresentando orifícios em suas paredes, que permitem o fluxo de ar entre os compartimentos da gaiola. Sendo assim, a gaiola permite que o rato obtenha informações sensoriais visuais, auditivas e olfativas de seu predador.

A área total da gaiola de comportamento corresponde a 28,81 cm². O espaço destinado ao rato corresponde a um retângulo com área de 7,56 cm² e altura de 16 cm. Em sua face frontal, a gaiola apresenta um orifício circular, destinado a receber o aplicador de presas, e um suporte que acomodará o bebedouro para os ratos. As paredes laterais e a parede do fundo apresentam duas fileiras de orifícios, que comunicam a gaiola do rato com a gaiola do gato. O teto da gaiola do rato é removível, através de um sistema que se assemelha a uma “gaveta que corre sobre trilhos”. É através dessa abertura que o rato é introduzido na, e removido da gaiola.

As paredes laterais e do fundo da gaiola do rato se estendem a partir dos 16 cm de altura até os 31 cm de altura da gaiola de comportamento. Esta extensão da parede da gaiola tem como objetivo limitar a área da gaiola do gato, evitando que este se coloque sobre a gaiola do rato.

O espaço destinado ao gato se assemelha à letra “U”, com área de 21,25 cm² e 31 cm de altura. Possui orifícios, em sua parede lateral, que comunicam a gaiola do gato com o exterior. O gato é introduzido na gaiola através das duas portas, de 15 cm cada, que se encontram na face frontal da gaiola de comportamento.

Neste espaço em “U”, o gato é capaz de observar o rato de qualquer parte da gaiola, conferindo assim, uma maior ameaça ao animal experimental.

Figura 2: Fotografia da gaiola experimental onde o rato foi exposto ao predador natural (*Felis cattus*), e às baratas (*Leurolestes circunvagans*). **A:** gaiola em acrílico transparente perfurada com orifício na parede anterior onde era acoplado o fornecedor de presas (a) e bebedouro (b); **B:** ambiente adjacente em forma de U em acrílico branco para movimentação do gato junto às faces laterais e posterior da gaiola contendo o rato. (1-4: baratas; 5 e 6: pellets de ração).

Aplicador de presas

O aplicador de presas consiste em um tubo de PVC (14 cm de comprimento; 5 cm de diâmetro), com um êmbolo em seu interior. Na extremidade do tubo que será introduzida na gaiola do rato há uma tampa de fácil remoção que tem por objetivo evitar que as presas escapem do aplicador no momento da aplicação. No exato momento da disponibilização das presas, o aplicador é introduzido no orifício que dá acesso à gaiola do rato, e em seguida remove-se a tampa e projeta-se o êmbolo para frente, empurrando as presas para o interior da gaiola.

A esquematização abaixo demonstra os componentes do aplicador:

3.3. Seleção comportamental dos ratos utilizados em nossos experimentos.

Inicialmente foi realizada uma avaliação geral da resposta de medo inato e do comportamento predatório dos ratos. Para tal, 24 horas após a aquisição a partir do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e habituação ao Biotério do Departamento de Fisiologia, os animais foram submetidos a um período de manipulação que tem por objetivo minimizar ou abolir o estresse da manipulação durante a execução do protocolo experimental. Os animais foram manipulados por 30 minutos durante 5 dias. Após este período, os animais foram submetidos aos processos seletivos para a predação e, posteriormente, para a resposta de medo inato ao predador natural, que ocorrem em dias distintos. Este arranjo teve por objetivo evitar que uma possível associação da presença do rato na gaiola de comportamento com o gato, interferisse na sua motivação para predação.

Seleção para predação: esta etapa se inicia com a introdução dos ratos nas gaiolas de comportamento, onde permaneceram por 15 minutos. Ao final deste período, cinco baratas foram introduzidas na gaiola com o auxílio do aplicador de presas. Os ratos foram observados por 60 minutos; os que apresentaram a motivação e interação com as presas foram submetidos à seleção para a resposta de defesa.

Seleção para a resposta de defesa: esta etapa foi executada um dia após a seleção da predação, e foi iniciada com a introdução e permanência dos ratos na gaiola de comportamento por 15 minutos. Ao final deste período o gato foi introduzido na gaiola, sem que houvesse o contato físico entre os dois animais, mantendo somente o contato visual, auditivo e olfativo entre ambos. O gato, portanto, permaneceu em seu espaço delimitado na gaiola por 20 minutos. Os ratos que apresentaram a resposta defensiva tais como congelamento motor e escape, foram selecionados para prosseguirem no protocolo experimental até o dia do teste comportamental.

Após a seleção, os ratos foram submetidos ao protocolo experimental, conforme demonstrado na esquematização abaixo ou modificado, conforme será ilustrado adiante em experimentos envolvendo estereotaxia.

Esquema 1: Representação esquemática da sequência de etapas do protocolo experimental. **Hab:** habituação dos animais à gaiola experimental e ao experimentador; **Pred:** exposição dos animais às baratas na gaiola experimental; **TESTE:** os ratos são expostos às presas e ao predador natural no 10º dia do protocolo, a partir da data de seleção.

3.4. Habituação às condições experimentais e ao experimentador.

A habituação comportamental teve por objetivo expor os ratos ao ambiente no qual seria executado o teste comportamental, permitindo que estes se habituassem ao ambiente da gaiola comportamental e ao experimentador. Para isto, esta etapa foi executada por sete dias consecutivos, nos quais os ratos foram submetidos a cinco habituações (Hab) e a duas predações (Pred) (ver Esquema 1). Esta etapa foi iniciada com o transporte dos animais em gaiolas individuais, do biotério para a sala de comportamento, realizado sempre pelo mesmo experimentador, no mesmo horário. Na sala de comportamento, que se encontrava climatizada e isolada acusticamente, os ratos foram manipulados e introduzidos na gaiola de comportamento, onde permaneceram por 60 minutos. Ao final da sessão, os ratos foram colocados em suas gaiolas individuais e transportados de volta ao biotério.

Nesse período de sete dias de habituação, no terceiro e no quinto dia, após a manipulação, os animais foram introduzidos na gaiola comportamental, onde permaneceram por 15 minutos, e então foram disponibilizadas cinco baratas. Os ratos permaneceram por 60 minutos na gaiola de comportamento, e durante este período puderam expressar o comportamento predatório. Ao final da sessão de predação, os animais foram novamente manipulados e recolocados nas suas gaiolas individuais, e então, transportados de volta ao biotério.

3.5. Experimentos Comportamentais

3.5.1. Experimento 1: Teste Comportamental de ratos expostos conjuntamente às baratas e ao gato.

No décimo dia de protocolo, após o período de habituação, foi realizado o teste comportamental de ratos submetidos às presas e ao predador natural. Realizamos também, um grupo de animais que foram expostos ao predador natural apenas.

O teste se iniciou com a introdução do rato na gaiola de experimento, onde este permaneceu por duas horas em habituação. Ao final das duas horas de habituação a filmagem foi iniciada. Dez minutos após, as dez baratas foram disponibilizadas ao rato através do aplicador de presas. O rato permaneceu por 10 minutos em contato com as presas. Em seguida, o gato foi introduzido na gaiola experimental adjacente, onde permaneceu por 20 minutos. Ao final dos vinte minutos o gato foi removido da gaiola e a filmagem continuou por mais 30 minutos, conforme é representado esquematicamente abaixo (Esquema 2):

Esquema 2: Representação esquemática da sequência de etapas do protocolo experimental para o teste comportamental de exposição do rato, às presas e ao gato.

3.5.2. Experimento 2: Experimentos comportamentais envolvendo manipulações farmacológicas no Colículo Superior.

Todos os ratos utilizados em nossos experimentos comportamentais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para implantes de cânulas na região medial do colículo superior e após recuperação cirúrgica os ratos foram submetidos ao procedimento de seleção comportamental. Em seguida, foram habituados às condições experimentais e ao experimentador. No décimo dia, dia do teste 1, o rato canulado era exposto às presas e ao predador natural; e no décimo primeiro dia o rato canulado recebia uma microinjeção do agonista GABAérgico muscimol ou salina na região do CSm e então era exposto às presas e ao predador natural.

Esquema 3: Representação esquemática da sequência de etapas do protocolo experimental de manipulação farmacológica. **Hab:** habituação dos animais à gaiola experimental e ao experimentador; **Pred:** exposição dos animais às presas na gaiola experimental; **TESTE 1:** os ratos são expostos às presas e ao predador natural no 10º dia do protocolo, a partir da data de seleção; **TESTE 2:** os ratos são submetidos a manipulação farmacológica e são expostos às presas e ao predador natural no 11º dia do protocolo, a partir da data de seleção.

3.5.2.1. Cirurgia Estereotáxica para Implantação Bilateral de cânulas na região medial do Colículo Superior

Confecção das Cânulas: Cânulas de 12 mm foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (0,55 x 20; 24G 3/4 - BD®), com o auxílio de uma microretífica e de um paquímetro. Em seguida, a partir de fios de aço de 0,30 mm foram confeccionados os mandris de 12 mm. Estes foram introduzidos no interior das cânulas implantadas, logo após

a cirurgia, com o intuito de evitar que as cânulas fossem obstruídas com partículas provenientes da gaiola do animal.

Confeção das Agulhas Microinjetoras: A confecção das agulhas injetoras se iniciou a partir de um pedaço de 20 mm da agulha gengival (30G Curta - BD®), onde posteriormente foi fixado, a uma distância de 12,5 mm de sua extremidade distal, um segmento de 5,0 mm de uma agulha hipodérmica (0,55 x 20; 24G ¾ - BD®). Este segmento atuou como um “freio”, garantindo que somente 12,5 mm da agulha injetora fossem introduzidos no interior da cânula implantada no rato. A seguir, foi acoplado ao “freio” um segmento de tubo de polietileno (PE 10), cuja função foi proporcionar maior estabilidade entre a agulha injetora e as cânulas durante o período de um minuto da microinjeção, o qual a agulha injetora permaneceu no interior da cânula.

Procedimentos Pré-Cirúrgicos: Os ratos previamente manipulados que foram destinados à cirurgia estereotáxica pesavam cerca de 250g e foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal da solução proveniente da mistura de quetamina : xilazina : acepromazina (100:100:10 mg/mL), na dose de (100:20:3 mg/Kg). Em seguida, foi realizada tricotomia, onde se removeu os pêlos da região frontal, parietal e esquamosal da cabeça do rato. A seguir, foram removidas cartilagens da orelha do rato. Este procedimento teve por objetivo facilitar a fixação e garantir uma melhor estabilização da cabeça do animal ao aparelho estereotáxico (David Kopf®, Modelo 957). A seguir, o animal foi colocado na base do estereotáxico, tendo sua cabeça fixada pelas barras laterais, cujas pontas foram introduzidas no pavilhão auditivo. Após a cabeça ter sido fixada nas barras laterais, o incisivo superior foi fixado no adaptador.

Procedimentos Cirúrgicos: Uma incisão sagital na pele da cabeça do rato foi realizada, e em seguida quatro pontos das bordas de incisão foram presos com pinças *bulldog* e afastadas da

linha de incisão. Em seguida, a superfície do crânio foi limpa para que as suturas pudessem ser visualizadas.

A horizontalização do eixo anteroposterior do crânio é realizada com o auxílio de um capilar de vidro que foi afixado na torre do estereotáxico, e cuja extremidade distal é plana. As medidas do eixo dorsoventral foram realizadas na superfície do crânio ao nível do Bregma e de Lambda, e o crânio foi considerado horizontalmente nivelado somente quando as medidas dos dois pontos foram iguais. Em seguida, a região para a implantação da cânula foi localizada com o auxílio do capilar de vidro que foi posicionado a 6.00 mm posterior ao Bregma. Este ponto foi devidamente marcado, para que posterior confecção da “janela” craniana por onde a cânula foi implantada. Porém, antes deste procedimento, dois parafusos foram afixados no crânio, conforme representado na Figura 3. Tanto a janela craniana, quanto os orifícios para a fixação dos parafusos foram confeccionados com o auxílio de uma broca de metal que foi acoplada a rotacionada por uma microretífica. Todo o procedimento descrito neste parágrafo foi realizado com o auxílio de um microscópio cirúrgico (Technoscope pico with table console - Carl Zeiss Surgical®).

Figura 3: Vista dorsal do crânio de um rato Wistar mostrando os pontos de inserção dos dois parafusos e a janela craniana por onde as cânulas foram implantadas.

Para a implantação da cânula fizemos uso de um instrumento vulgarmente denominado “pé-de-pato”. A este instrumento é fixada a cânula guia, onde será encaixada a cânula que será implantada no encéfalo do animal. O “pé-de-pato” é afixado na torre do

estereotáxico através de sua haste. Uma vez que havia a possibilidade da haste do “pé-de-pato” rotacionar, também havia a possibilidade que a da cânula estivesse desalinhada no momento de ser implantada. Para evitarmos este erro alinhamos a cânula com o auxílio de uma linha reta presente em uma régua de precisão. Esta régua foi colocada sobre uma mesa de acrílico que se encontrava a cinco centímetros acima do animal, e foi alinhada com as barras laterais do estereotáxico. Todo o processo de alinhamento foi realizado com o auxílio de um microscópio cirúrgico (Technoscope pico with table console - Carl Zeiss Surgical®).

Após o alinhamento da cânula, ela foi posicionada ao nível do Bregma, sendo registrada a coordenada em milímetros correspondente ao ponto, a partir do eixo anteroposterior. Em seguida, a cânula foram conduzidas a 6.00 mm posterior ao Bregma, para que pudéssemos determinar o exato local de sua implantação. A cânula foi posicionada na linha média do vaso medial e daí afastada 0.7mm lateralmente, e então a cânula foi dorsalmente posicionada na superfície do encéfalo. Neste ponto foi registrada, em milímetros, a coordenada do eixo dorsoventral correspondente ao ponto de implantação. A seguir, as meninges foram rompidas para evitar que a implantação da cânula fosse prejudicada. Em seguida, a cânula foram conduzida até a superfície cortical onde obteve contato a partir de sua extremidade distal. Delicadamente, a cânula foi conduzida a 3.0 mm abaixo da superfície cortical (Esquema 4). Todo o procedimento descrito neste parágrafo foi realizado sob o auxílio do microscópio cirúrgico (Technoscope pico with table console - Carl Zeiss Surgical®).

Esquema 4: Corte coronal do encéfalo de um rato Wistar mostrando em detalhes o local da injeção de muscimol na camada intermediária cinzenta do Colículo Superior. Coordenadas MedioLateral: 0.7 mm; DorsoVentral: 3.5 mm a partir da superfície encefálica; AnteroPosterior: 6.00 mm caudal ao Bregma (Paxinos e Watson, 2007). MG: Complexo Geniculado; PAG: Substância Cinzenta Periaquedutal; SC: Colículo Superior; SGS e SO: camada superficial do SC; SGI: camada intermediária cinzenta; SAI: camada intermediária branca; SGP: camada cinzenta profunda; SAP: camada branca profunda.

Após a cânula ter sido implantada, foi colocado em torno desta um pequeno pedaço de Parafilme® com o intuito de evitar o contato direto da superfície encefálica com o cimento acrílico. O capacete de cimento acrílico foi confeccionado ao misturarmos o pó com o líquido autopolimerizantes (JET® - Clássico), que posteriormente foi colocado delicadamente sobre o crânio do animal. Tivemos o cuidado necessário para garantir que o cimento acrílico envolvesse e cobrisse os parafusos, assim como para que fosse preenchido o espaço entre as duas cânulas. O uso deste cimento acrílico teve como objetivo fixar as cânulas, pois uma vez envolvidas pelo acrílico estas cânulas também estarão fixadas ao crânio, já que o acrílico também estará preso aos dois parafusos fixados no crânio. Na finalização desta etapa da cirurgia, é fixado sobre o capacete de acrílico, e ao redor das duas cânulas um cilindro plástico de oito milímetros de altura. A implantação deste cilindro forneceu uma proteção à cânula e ao mandril contra uma possível manipulação executada pelo rato.

Procedimentos Pós-Cirúrgicos: Após completa secagem do capacete de acrílico, a haste do estereotáxico foi delicadamente suspensa, permitindo que a cânula guia fosse removida do interior da cânula implantada. Em seguida, o animal foi removido do estereotáxico e

submetido à sutura dos cortes realizados na base da orelha para a remoção das cartilagens. Por fim, foi introduzido um mandril no interior da cânula implantada, e em seguida os ratos foram colocados em gaiolas individuais contendo cama de serragem (maravalha), sobre a qual foram disponibilizados *pellets* de ração e água. Após retornarem do plano anestésico, os animais foram transportados de volta o biotério.

3.5.2.2. Injeção do agonista GABAérgico muscimol na região medial do Colículo Superior.

Vinte quatro horas após a cirurgia foi iniciada a etapa de habituação dos animais. A habituação comportamental teve por objetivo expor os ratos ao ambiente no qual seria executado o teste comportamental, permitindo que estes se habituassem ao ambiente da gaiola comportamental e ao experimentador. Para isto, esta etapa foi executada por sete dias consecutivos, nos quais os ratos foram submetidos a cinco habituações (Hab) e a duas predações (Pred) (ver Esquema 3). Esta etapa foi iniciada com o transporte individualizado dos animais do biotério para a sala de comportamento, realizado sempre pelo mesmo experimentador, e no mesmo horário. Na sala de comportamento, que se encontrava climatizada e isolada acusticamente, os ratos foram manipulados e introduzidos na gaiola de comportamento, onde permaneceram por 30 minutos. Em seguida, foram removidos da gaiola comportamental e colocados numa caixa de polietileno (16 x 15 x 30 cm) que também foi usada no dia do teste 2 para realização da injeção de muscimol. Enquanto os ratos permaneceram na caixa, o experimentador acionava a bomba microinjetora em dois momentos para que os animais se habituassem ao som da bomba que é usada no dia do teste 2. Dessa forma simulávamos a captação da solução de muscimol por um minuto, e em seguida simulávamos a liberação da droga ligando a bomba por mais um minuto. Um minuto após esta simulação, os ratos eram re-colocados à gaiola de comportamento onde permaneceram por mais 25 minutos, totalizando 60 minutos do processo de habituação. Ao

final da sessão, os ratos foram re-introduzidos em suas gaiolas individuais e transportados de volta ao biotério.

Nesse período de sete dias de habituação, no terceiro e no quinto dia, após a manipulação, os animais foram introduzidos na gaiola comportamental, onde permaneceram por 15 minutos, e então foram disponibilizadas dez baratas. Os ratos permaneceram por 60 minutos na gaiola de comportamento, e durante este período puderam expressar o comportamento predatório. Ao final da sessão de predação, os animais foram novamente manipulados e recolocados nas suas gaiolas individuais, e então, transportados de volta ao biotério.

3.5.2.3. Teste Comportamental de ratos canulados na região medial do Colículo Superior e expostos às baratas e ao gato.

No décimo dia de protocolo # 2, após o período de habituação dos ratos canulados, foi realizado o teste comportamental desses ratos na presença de presas e do predador natural, para que pudéssemos verificar se ocorria algum efeito da cânula no comportamento de predação ou na resposta defensiva. No décimo primeiro dia esses animais, agora sob efeito da microinjeção de muscimol foram expostos às presas e ao predador natural.

Assim, o teste comportamental se iniciou com a introdução do rato canulado na gaiola de experimento, onde este permaneceu por duas horas em habituação. Ao final das duas horas de habituação a filmagem foi iniciada. Após dez minutos, dez baratas foram disponibilizadas ao rato através do aplicador de presas. O rato permaneceu por 10 minutos em contato com as presas. Em seguida, o gato foi introduzido na gaiola experimental adjacente, onde permaneceu por 20 minutos. Ao final dos vinte minutos o gato foi removido da gaiola e a filmagem continuou por mais 30 minutos.

No décimo primeiro dia executamos o mesmo teste comportamental agora sob efeito do muscimol na região medial do Colículo Superior. Durante as duas horas de habituação, o

experimentador preparou a solução do agonista GABAérgico, muscimol. A solução de muscimol (Sigma®) foi preparada a partir da alíquota de 30 µg de muscimol em 120 µL de salina 0.9%.

Ao final da habituação o rato foi removido da gaiola comportamental e introduzido numa caixa de polietileno. Em seguida, foi realizada a captação da solução de muscimol. Tanto a captação, quanto a microinjeção da solução de muscimol ou salina, executada pela bomba de microinjeção (Pump 11 Pico Plus® – HARVARD apparatus) foram realizadas com o auxílio de uma microseringa de 10 µL (HAMILTON®), onde foi acoplado um tubo flexível de polietileno (PE 10 - Becton Dickinson®). Na outra extremidade do tubo de polietileno foi acoplada uma agulha de microinjeção de 12,5 mm, conforme descrito anteriormente a injetora foi 0,5mm mais extensa que a cânula. Dessa maneira, a ponta da agulha de microinjeção, e conseqüentemente o ponto de injeção, se localizaram a 0,5 mm abaixo da extremidade distal das cânulas implantadas.

Enquanto o rato permaneceu na gaiola, o experimentador acionou a bomba de microinjeção, iniciando a etapa de captação da solução de muscimol. A seguir, o mandril foi removido do interior da cânula implantada no rato, e a agulha injetora foi introduzida no interior da cânula. Então, acionando-se novamente a bomba, se realizou a microinjeção de 100ng de muscimol no CSm, a partir da microinjeção unilateral de 400 nL de solução, numa velocidade de 400 nL/minuto. Após a microinjeção, os ratos ainda permaneceram, por um minuto, com a agulha microinjetora introduzidas no interior da cânula para que não ocorresse a dispersão do muscimol ao longo do trajeto da microinjetora no interior da cânula. Logo em seguida, o rato retornou para a gaiola de comportamento.

Cinco minutos após, as dez baratas foram disponibilizadas ao rato através do (Figura 4) aplicador de presas, e o rato permaneceu por 10 minutos em contato com as presas. Em seguida, o gato foi introduzido na gaiola experimental adjacente, onde permaneceu por 20

minutos. Ao final dos vinte minutos o gato foi removido da gaiola, e a filmagem foi interrompida (Esquema 5).

Esquema 5: Representação esquemática da sequência de etapas do protocolo experimental para o teste comportamental de exposição às presas e ao gato após microinjeção bilateral de muscimol no CSm de ratos .

Figura 4: Fotografia de um rato canulado e submetido ao procedimento de microinjeção durante o teste comportamental. Em detalhes, 1) cilindro plástico de proteção da cânula e do mandril; 2) agulha de microinjeção introduzida no interior da cânula; 3) tupo de polietileno (PE10) que foi conectado à microinjetora e à microseringa de 10 µL.

3.5.3. Experimento 3: Teste Comportamental de ratos expostos às baratas e ao gato, após 72 horas de privação alimentar.

A idealização deste protocolo teve por objetivo observar se o rato em restrição alimentar de 72 horas interromperia a predação de insetos à medida que o predador natural fosse introduzido na gaiola experimental e expressaria resposta de defesa. É importante considerar que nessa situação o rato encontra-se em circunstância mais críticas envolvendo a integridade física e o estado fisiológico crítico para a sobrevivência.

Conforme o protocolo 3, no dia do teste os animais que estavam em restrição alimentar por 72 horas foram conduzidos à sala de comportamento, onde foram removidos da gaiola individual, manipulados e introduzidos na gaiola de comportamento, permanecendo nesta em habituação por 2 horas. Ao final deste período, se iniciou a filmagem do evento. Dez minutos após, dez baratas foram disponibilizadas ao rato com auxílio do aplicador de presas. Após 10 minutos o gato foi introduzido na gaiola de comportamento, onde permaneceu por 20 minutos. Ao final dos vinte minutos o gato foi removido da gaiola e a filmagem continuou por mais 30 minutos.

3.6. Perfusão e Histologia.

Em nosso projeto, a execução da perfusão-fixação foi realizada 60 minutos após o a sessão comportamental, objetivando que o tecido nervoso encefálico fosse fixado durante o período de pico acúmulo da proteína *Fos* no núcleo celular, que ocorre de 60 a 90 minutos após o estímulo. Os animais foram anestesiados através de injeções por via intraperitoneal da seguinte associação anestésica: Quetamina (100 mg.kg^{-1}) + Xilazina (20 mg.kg^{-1}) + Acepromazina (3 mg.kg^{-1}).

Perfusão-Fixação: a perfusão é o primeiro passo na preparação do tecido de experimentos neuroanatômicos para a microscopia, tendo como objetivo a preservação do tecido para que este se mantenha em um estado próximo ao natural durante os processos subseqüentes, durante a estocagem, e durante a microscopia.

A perfusão para a conservação de tecido foi realizada através do fluxo intravascular forçado de uma solução com propriedades fixadora-conservadora, por meio de uma bomba peristáltica. Fixadores servem para estabilizar os detalhes estruturais de células e tecidos (Fox *et al.*, 1985), e em especial os aldeídos, que são os fixadores mais comumente utilizados, desempenham tal função através da formação de ligações, com proteínas, conhecidas como “pontes de metileno”. Em nosso laboratório, utilizamos como fixador o paraformaldeído (95

%, Sigma-Aldrich®). Paraformaldeído é um grande polímero de formaldeído comercializado na forma de um pó branco (Kiernan, 2000). Para ser útil como um fixador, a solução deverá conter o formaldeído monomérico como seu principal soluto. Para isso, o polímero de paraformaldeído deverá ser hidrolisado a formaldeído, sendo esta reação catalisada pela presença de íons OH⁻, encontrado em soluções levemente alcalinas, e por um tratamento térmico da solução (Kiernan, 2000).

Execução da Perfusão: o animal foi submetido a uma perfusão trans-aórtica com auxílio de uma bomba peristáltica que bombeava solução salina 0.9 % a temperatura ambiente, e uma solução fixadora tamponada de formaldeído 4 %, pH 7.4 a 4°C durante 15 minutos. Para isso, o animal devidamente anestesiado foi afixado em decúbito dorsal, numa plataforma de dissecação por meio de presilhas colocadas nas patas, onde foi submetido a uma incisão abdominal, tendo como referência um ponto logo abaixo da cartilagem xifóide. Em seguida, a cartilagem xifóide foi presa com uma pinça, e erguida para expor o diafragma. Com o auxílio de uma tesoura, o diafragma foi removido da caixa torácica, que em seguida foi erguida para expor o coração. Rapidamente, o coração foi imobilizado com o auxílio dos dedos polegar e indicador, e em seguida foi realizado um corte no ápice do coração, na porção ventricular esquerda. Posteriormente, uma agulha de intubação foi inserida no ventrículo esquerdo a partir do ápice, sendo conduzida até a base do coração onde, foi gentilmente empurrada para dentro da luz aórtica. Em seguida, a agulha foi mantida juntamente com a aorta, logo acima da base cardíaca, por meio de uma pinça arterial do tipo “bulldog”. Imediatamente, foi realizada uma secção no átrio direito, e em seguida se iniciou o fluxo de 200 mL de solução salina 0.9 %. Ao final da perfusão de salina se iniciou a perfusão do fixador. No início da perfusão do fixador, foram removidas as presilhas das patas dianteiras do rato para que pudessemos assistir a ocorrência de fasciculações musculares dos membros anteriores. Esta etapa é importante, pois uma boa perfusão é caracterizada por fasciculações dos músculos quando exposto ao fixador, seguido por um

rápido enrijecimento dos músculos (Bolam, 1992). Seguindo a ocorrência das fasciculações, rapidamente foi colocado gelo ao redor e sobre a cabeça do animal, enquanto a perfusão do fixador foi mantida por um período de 15 minutos. Em seguida, para finalizar a perfusão, foi retomada a perfusão de 150 mL de solução salina 0.9 %.

Ao final da perfusão os animais foram colocados em saco plástico branco e destinados a geladeira. Cerca de duas a três horas após a perfusão o encéfalo foi removido do crânio, e mantido por 24 horas em solução pós-fixadora de 20 % de sacarose em tampão fosfato de sódio.

Microtomia: Após período de pós-fixação, o encéfalo foi colocado em uma placa de Petri onde, com o auxílio de um microscópio cirúrgico, foram removidas as meninges. Em seguida, com o auxílio de uma lâmina, foram realizadas secções coronais na porção rostral e caudal do encéfalo, objetivando a confecção de uma base plana necessária para afixar, posteriormente, o encéfalo no micrótomo. Marcações longitudinais, de um mesmo lado do encéfalo, no sentido rostro-caudal em ambas as superfícies dorsais e ventrais do encéfalo foram realizadas. Este procedimento teve por objetivo identificar os lados direito e esquerdo do corte, durante o processo de confecção das lâminas para a análise microscópica.

Em seguida, o encéfalo foi conduzido a um micrótomo de deslizamento (Leica SM 2000R - Leica®), sendo afixado perpendicularmente à plataforma congelada do micrótomo. Assim, a superfície ventral do encéfalo esteve voltada para o manipulador, enquanto a superfície dorsal estivera voltada para a lâmina do micrótomo. Em seguida, o encéfalo foi recoberto com gelo seco macerado para que aquele estivesse na temperatura e textura adequadas para a realização dos cortes.

Os cortes foram confeccionados com espessura de 30 µm, através da movimentação manual da lâmina do micrótomo, e coletados com o auxílio e um pincel umedecido em KPBS 0,02 M. Entretanto, antes que os cortes fossem coletados para a imunohistoquímica foi

necessário ajustar a simetria do plano de corte. A estrutura analisada e estabelecida como referência para a análise de simetria foi o nervo facial (7º par de nervos cranianos).

A coleta seqüencial dos cortes foi realizada em quatro placas contendo vinte e quatro poços, de modo que armazenamos quatro amostras representativas de toda a extensão rostrocaudal do encéfalo. A distância entre os cortes adjacentes coletados numa mesma placa foi de 120 µm.

Ao final da microtomia os cortes depositados na placa com KPBS foram lavados em KPBS por 30 minutos, e em seguida incubados em anticorpo primário para imunodeteção da proteína *Fos*.

Os cortes coletados na placa contendo azida de sódio 0,02 % foram destinados à montagem de lâminas, e posteriormente foram submetidos à coloração de Nissl. Esta coloração revela a citoarquitetura dos cortes adjacentes àqueles submetidos à imunohistoquímica, sendo uma importante referência para a localização das regiões que tiveram imunomarcações para proteína *Fos*.

3.7. Detecção imunohistoquímica da proteína *Fos* em encéfalo de ratos usados em nossos experimentos comportamentais envolvendo exposição às presas e ao predador natural.

A detecção da proteína *Fos*, para posterior análise microscópica das regiões marcadas, se inicia com a incubação dos cortes em solução KPBS 0,02 M, contendo Triton X-100® 10 %, Soro Normal de Cabra 2% e anticorpo primário *anti-Fos* (AB-5, Calbiochemical®) na diluição 1:20.000, onde permaneceram na geladeira em rotômetro (angulação: 45°; velocidade: 5 rpm) por 72 horas.

Lavagens sucessivas com KPBS 0,02 M foram realizadas antes dos cortes terem sido incubados em solução contendo anticorpo secundário. A solução do anticorpo secundário foi confeccionada a partir de KPBS 0,02 M contendo Triton X-100® 10 %, Soro Normal de Cabra 2

% e anticorpo secundário na diluição 1:200 (Biotinylated Anti-Rabbit IgG [Goat], Vector Laboratories®), onde permaneceram por 1 hora e 30 minutos.

Após a lavagem em KPBS 0,02 M, os cortes foram incubados por 1 hora e 30 minutos em solução contendo o complexo avidina-biotina-peroxidase (1:200) (ABC Elite Kit, Vector Laboratories®).

Ao final da incubação, os cortes foram submetidos a sucessivas lavagens em KPBS 0,02 M antes de serem conduzidos à reação de diaminobenzidina (DAB). A reação de DAB foi uma etapa importante do processo imunohistoquímico de identificação da proteína *Fos*, uma vez que o polímero de DAB se deposita nos sítios de ligação do complexo de anticorpos. Os cortes foram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente numa solução recém preparada de DAB 0,05 %, constituída de 50 mg de 3-3' diaminobenzidina, 2 mL de Nickel Amonium, 600 µL de glicose oxidase 0,1 %, 40 mg de cloreto de amônio . Em seguida foi adicionada β -D-glicose na solução de DAB 0,05 % contendo os cortes (Itoh *et al.*, 1979; Shu *et al.*, 1988). A reação de DAB foi interrompida ao transferir os cortes para a solução de KPBS 0,02 M.

A seguir, os cortes foram montados em lâminas e tratados em solução de tetróxido de ósmio 0,05M (Newman *et al.*, 1983). Os cortes foram desidratados e as lâminas recobertas com DPX e lamínulas de vidro. Após secagem, as lâminas foram levadas ao microscópio de campo claro (Leica - DM 2500®) para análise das marcações. Após análise, as imagens foram capturadas a partir do microscópio com o auxílio de uma câmera (Leica - DFC 290®). As imagens capturadas foram preparadas utilizando Adobe® Photoshop® CS4, ajustando-se apenas a nitidez, o contraste e o brilho.

3.8. Análise Comportamental

Todo o teste comportamental foi filmado para posterior análise dos parâmetros comportamentais estabelecidos. A filmagem do comportamento foi efetuada por uma filmadora digital, a qual se encontrava disposta acima das gaiolas, sob uma haste de metal de dois metros afixada nas duas paredes laterais da sala de comportamento, onde a filmadora tinha liberdade para “correr” por toda a extensão da haste. Sendo assim, os parâmetros comportamentais foram analisados a partir das imagens obtidas de uma vista superior da gaiola comportamental (Figura 2).

Em nossa análise, foram avaliados os seguintes elementos comportamentais:

- tempo total de contato com as presas: através da análise das imagens obtidas por uma vista superior foi considerado como contato com as presas quando estas desapareciam debaixo do rato na região que se estende dos ombros até o focinho;
- tempo total de *hunting*: foi considerado como *hunting* os movimentos laterais e dianteiros da cabeça e do corpo do rato em direção às presas;
- tempo total que o rato permaneceu em *freezing*: período no qual o rato permaneceu em completo congelamento motor.
- tempo total de avaliação de risco: foi considerado como avaliação de risco quando o rato, em imobilidade, farejava (*sniffing*) e/ou executava movimentos translacionais com a cabeça sem sair do local.
- tempo total comportamento exploratório.
- tempo total utilizado para execução de outros comportamentos exceto os descritos anteriormente, tais como: comportamentos que revelaram indícios de atividade não relacionadas com a resposta de defesa ou de predação, como autolimpeza e ingestão de água e ração.

A quantificação dos parâmetros comportamentais definidos foi realizada com o auxílio do *software* de análises The Observer-XT® (Noldus Information Technology).

3.9. Análise do número de células imunorreativas à proteína Fos.

Os cortes imunorreagidos para proteína Fos foram observados ao microscópio óptico em campo claro, sendo realizada uma análise qualitativa do padrão de marcação nos sítios neurais sabidamente ativos durante a predação e durante a execução da resposta de defesa ao predador natural.

Nos nossos estudos, os setores de maior interesse foram os níveis rostrocaudais intermediários do CS, onde observamos um maior desenvolvimento do CS, região em que o ângulo formado entre o CS e o núcleo geniculado medial do tálamo se apresenta mais proeminente (AP $\cong$ -6.0mm) o núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (PMd; AP $\cong$ -4.16mm). Sabidamente, estudos prévios de lesões neuroquímicas bilaterais nesses setores revelaram a ocorrência de déficits comportamentais da resposta predatória, quando o CSl foi lesionado (Comoli e Canteras, 2000; Furigo et al., 2010), e a extinção das respostas defensivas em ratos que estiveram diante do predador natural, quando a lesão se localizou no PMd, que é considerado um setor chave na resposta de defesa ao predador (Canteras *et al.*, 1997).

Assim realizamos uma estimativa do número de células imunorreativas para proteína Fos no CS e PMd nos seguintes grupos de animais: ratos expostos somente à barata (**RxG**; CS: N= 5) (observações do nosso laboratório), ratos expostos somente ao gato (**RxG**; CS: N= 5; PMd: N =4), ratos expostos ao gato e às baratas (**RxGxB**; CS: N= 5; PMd: N =4), e dois grupos de ratos sob restrição alimentar de 72 horas que foram expostos também ao gato e às baratas (**RjxGxB 1**; CS: N= 5; PMd: N =4/ **RjxGxB 2**; CS: N= 5; PMd: N =4).

Os cortes selecionados foram desenhados com auxílio de uma câmara lúcida acoplada ao microscópio óptico (Leica DM 2500), em aumento de 40x.

Os limites internos e externos das estruturas foram desenhados em campo escuro, e os núcleos marcados com Fos foram desenhados em campo claro. Ainda no mesmo aumento, com o auxílio da câmera lúcida e utilizando-se um retículo, foi delimitada a área correspondente a um quadrado de 300 x 300 µm para realização da contagem dos núcleos marcados na região medial e lateral do colículo superior, e de 200 x 200 µm para a região do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo. Os quadrados foram posicionados nas regiões de interesse, conforme ilustrado nas Figuras 5 e 6.

Figura 5 – Representação esquemática de corte frontal do cérebro do rato ao nível do CS (AP $\approx$ 6.00mm), retirada do atlas “The Rat Brain in the stereotaxic coordinates”, Paxinos e Watson (2007), 6a edição. Os quadrados em vermelho ilustram os locais onde foram realizadas contagens de núcleos marcados com proteína Fos. MG: Complexo Geniculado; PAG: Substância Cinzenta Periaquedutal; SC: Colículo Superior; SGS e SO: camada superficial do SC; SGI: camada intermediária cinzenta; SAI: camada intermediária branca; SGP: camada cinzenta profunda; SAP: camada branca profunda.

Figura 6 – Representação esquemática de corte frontal do cérebro do rato ao nível do PMd (AP $\approx$ 4.84mm), retirada do atlas “The Rat Brain in the stereotaxic coordinates”, Paxinos e Watson (2007), 6 edição. O retângulo em vermelho ilustra o local onde foi realizada a contagem de núcleos marcados. PMd: núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo.

3.10. Análise Estatística.

Para verificar a existência de não igualdade na análise dos parâmetros comportamentais dos experimentos 1 e 3, aplicamos um teste paramétrico para a análise de variância (ANOVA), seguido por comparações entre grupos através do teste post hoc de Kruskal-Wallis. Da mesma forma utilizamos a análise de variância (ANOVA), seguido do teste pot hoc de Kruskal-Wallis para a análise dos dados referente à marcação de proteína Fos.

Para o experimento 2 a existência de não igualdade entre dois grupos foi avaliada utilizando-se um teste *Student t* não-pareado, para as análises dos parâmetros comportamentais.

Os dados são expressos em média $\pm$ erro padrão. Um nível de significância de 0,05 foi adotado em todos os testes efetuados. Os testes foram feitos com auxílio do software GraphPad InStat®, versão 3.05. Os gráficos foram elaborados com auxílio do software GraphPad Prism®, versão 5.00.

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1

Análise qualitativa da resposta comportamental de ratos expostos às baratas.

Em nosso laboratório, ratos expostos somente às baratas (N= 5) desempenharam um padrão do comportamento predatório similar àqueles descritos por Comoli et al. (2005). O padrão seqüencial executado por ratos durante o comportamento de predação de baratas se inicia com a busca e captura do inseto. Normalmente a captura da presa era executada pelas patas dianteiras ou diretamente com a boca, podendo o rato iniciar a ingestão da presa no mesmo local da captura, ou este transportava a presa, ainda na boca, até um canto da gaiola oposto àquele onde a presa foi capturada. Antes de iniciar a ingestão da presa, e com o auxílio das patas dianteiras, o rato posicionava a barata de maneira a permitir que a primeira mordida fosse empregada na cabeça do inseto, arrancando-a. O rato continuava a predação, seguindo com a ingestão do tórax e finalizando no abdome do inseto. Esta seqüência topográfica da ingestão, sempre no sentido crânio-caudal da presa, foi desempenhada por todos os animais.

Resposta Comportamental de ratos expostos ao predador natural.

Ratos expostos ao predador natural classicamente apresentam um repertório de respostas de defesa que é influenciada pela distância na qual o predador se encontra (Blanchard e Blanchard, 2008). Em nossos estudos, observamos que no momento em que o gato era introduzido na gaiola comportamental, os ratos iniciavam uma rápida exploração pela gaiola, onde farejavam por através dos orifícios. Rapidamente os ratos passaram a executar respostas de defesa, que na maior parte do tempo foi representada pelo congelamento motor (*freezing*), sendo eventualmente interrompido para avaliação de risco, caracterizada por movimentos translacionais da cabeça e pelo farejar (*sniffing*) sem que o animal desloque-se. Em toda a análise qualitativa do comportamento, observamos que as respostas desempenhadas pelos animais não seguiram a relação entre as respostas de defesa e a distância do predador, descrita pelos Blanchard (Schenberg et al., 2005), já que numa

distância do predador, que era inferior a um metro, os nossos animais expressaram freezing ao invés de ataques e ameaças defensivas.

A análise quantitativa do comportamento de animais expostos somente ao gato revelou que o congelamento motor foi a resposta predominante diante do predador (*freezing*: 980.60 ± 33.12 seg *vs* avaliação de risco: 95.00 ± 33.29 seg ; outros: 4.40 ± 1.77 seg ; N= 5) (Figura 7).

Resposta Comportamental de ratos expostos às baratas e ao predador natural.

Os ratos que foram expostos conjuntamente às baratas e ao gato desempenhavam a predação das baratas no momento em que o gato foi introduzido na gaiola de comportamento. A partir deste momento, os ratos interromperam a predação e inicialmente exploraram a gaiola momentaneamente, antes de executar as respostas de defesa. Assim, como os ratos expostos somente ao gato, estes permaneceram a maior parte do tempo na presença do predador, executando as respostas de defesa (*freezing*: 808.40 ± 90.45 seg ; avaliação de risco: 278.00 ± 89.83 seg *vs hunting*: 0.0 ± 0.0 seg ; contato: 0.0 ± 0.0 ; outros: 1.00 ± 1.00 seg ; N= 5) (Figura 7). Comparados aos animais expostos somente ao gato, os ratos RxGxB não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros comportamentais analisados (*freezing*: P= 0.3095; avaliação de risco: P= 0.3095; outros: P= 0.0556) (Figura 7).

Figura 7: Análise Comportamental de ratos expostos ao gato (RxG) (n=7) e ratos expostos ao gato e às baratas (RxGxB) (n=7). Foi mensurado o tempo total em *freezing*; avaliação de risco e o tempo total de execução de outros comportamentos; Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

Análise Imunohistoquímica

Realizamos a estimativa do número de células imunorreativas a proteína Fos no Colículo Superior (CS) de animais expostos somente às baratas (RxB) (resultados do nosso laboratório), de animais expostos somente ao gato (RxG), e animais expostos às baratas e ao gato (RxBxG). Os nossos animais do grupo RxB apresentaram no CS um padrão de Fos semelhante àquele descrito na literatura (Comoli e Canteras, 2002; Comoli e Gouvea, 2009; Furigo et al., 2010). Ratos que predaram as baratas apresentaram uma maior imunoreatividade à Fos na camada intermediária do CS ℓ , quando foram comparados à mesma camada do CS m (504.44 ± 17.77 células/mm² vs CS m : 100 ± 3.51 células/mm²; n= 5; P<0.0001) (Figura 8). Diferente dos animais que predaram, os animais do grupo RxG revelaram uma maior imunoreatividade à Fos na camada intermediária do CS m , quando foram comparados ao CS ℓ (382.22 ± 22.66 células/mm² vs CS ℓ : 15.55 ± 2.72 células/mm²; n= 5; P=0.0001) (Figura 8).

Figura 8: Os histogramas mostram a densidade de Fos em sítios específicos na camada intermediária das regiões mediais (CSm) e laterais (CSl) do Colículo Superior de ratos expostos somente às baratas ou somente ao predador natural. Os valores representam o número de células imunoreativas à Fos/mm². Dados são apresentados como média ± erro padrão da média. *Diferenças significativas na análise entre as regiões CSm e CSl de cada grupo experimental, $P < 0.0001$.

Em animais do grupo RxGxB, observamos uma maior imunorreatividade à Fos no CSm, quando comparado ao CSl (266.66 ± 14.48 células/mm² vs CSl: 33.33 ± 351 células/mm²; n= 5; $P < 0.0001$) (Figuras 9, 14B e 15B).

Figura 9: O histograma mostra a densidade de Fos em sítios específicos na camada intermediária das regiões mediais (CSm) e laterais (CSl) do Colículo Superior de ratos expostos às baratas e ao predador natural. Os valores representam o número de células imunoreativas à Fos/mm². Dados são apresentados como média ± erro padrão da média. *Diferenças significativas na análise entre as regiões CSm e CSl do grupo experimental, $P < 0.0001$.

Sob uma análise quantitativa, observamos que o padrão de distribuição de células imunorreativas à Fos no CS dos animais do grupo RxGxB se assemelha àquele apresentado pelo grupo RxG (Figura 10).

Figura 10: Os histogramas mostram a densidade de Fos em sítios específicos da camada intermediária das regiões mediais (■) e laterais (□) do Colículo Superior de ratos dos grupos RxG, RxB e RxGxB (N= 5/grupo). Os valores representam o número de células imunoreativas à Fos/mm². Dados são apresentados como média ± erro padrão da média. ***Diferenças significativas na análise da região do CSm quando comparados aos grupos RxB, P<0.001. •••Diferenças significativas na análise da região do CSl quando comparados ao grupo RxG, P<0.001.

4.2. Experimento 2.

Estudos comportamentais envolvendo manipulações farmacológicas no Colículo Superior

Realizamos a implantação de cânulas na região do CSm de ratos para realização dos nossos experimentos de manipulação farmacológica com o muscimol (n = 6), ou salina (n=6) (Figura 11).

Durante o processo de habituação os animais canulados foram expostos às baratas em duas ocasiões. Em ambas, os animais executaram a caça predatória e realizaram a ingestão das presas, não sendo observado qualquer comprometimento motor na execução da predação. No dia do teste 1 estes animais foram novamente expostos às baratas e ao gato. Estes animais iniciaram a predação das baratas, mas em seguida, na presença do gato

interromperam e não retomaram a execução do comportamento predatório, conforme também observado no grupo RxGxB, do experimento descrito anteriormente. No dia do teste 2, sob efeito da injeção de muscimol ou salina no CSm, os animais foram expostos as baratas e ao gato.

Figura 11: Fotografia de um corte transversal do cérebro de rato corado pelo método da Tionina ao nível do colículo superior demonstrando o trajeto seguido pela cânula implantada e o sítio da microinjeção de muscimol (x50).

Observamos que os ratos que receberam injeção de muscimol da região do CSm não apresentaram resposta predatória quando expostos as presas e ao predador natural, assim como os ratos que receberam injeção de salina na região do CSm. Interessantemente sob efeito do muscimol esses animais apresentaram um aumento significativo no comportamento exploratório; eles passaram a se deslocarem bem mais ao longo da gaiola experimental comparados aos animais que receberam injeção de salina no CSm mesmo na presença do predador natural (*comportamento exploratório* grupo muscimol: 258.00 ± 40.73 seg *vs* grupo salina: 127.50 ± 34.44 seg; $P = 0.03$); ainda, eles apresentaram uma redução da resposta de congelamento motor (*freezing* grupo muscimol: 717.16 ± 65.23 *vs* grupo salina $839,66 \pm 43.14$ seg) (Figura 12).

Figura 12: Análise Comportamental de ratos expostos ao gato e às baratas sob efeito de injeção unilateral de muscimol (n=6) e salina (n=6) na região do CSM. Foi mensurado o tempo total em *freezing*; avaliação de risco e o tempo total de execução de comportamento exploratório. Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. *Diferenças significativas na análise entre os grupos $P < 0.05$.

4.3 Experimento 3

Análise Comportamental dos ratos exposto às baratas e ao predador natural conjuntamente após restrição alimentar de 72 horas.

Inicialmente, quando realizamos a análise comportamental de ratos privados de alimento por 72 horas ao serem expostos ao predador natural e as baratas, observamos que o comportamento de predação de baratas era executado pela maioria dos animais. Entretanto, na medida em que aumentamos o número de indivíduos da nossa amostra, observamos que 50 % dos animais executavam a predação na presença do gato e os outros 50% expressavam respostas de defesa. Dessa maneira fizemos uma análise do material histológico e notamos indícios muito fortes no que diz respeito à mobilização dos circuitos neurais envolvidos na defesa. Mediante tal circunstância, entendemos que seria mais correto fazer uma distinção dos animais privados de alimento em dois grupos para a nossa análise comportamental, assim denominados: animais que permaneceram predando na presença do gato (RjxGxB 1), e animais que expressaram respostas de defesa (RjxGxB 2).

No grupo RjxGxB 1 (n = 5), os ratos permaneceram predando as baratas mesmo na presença do predador. Inicialmente, estes animais iniciaram uma exploração pela gaiola por um momento, mas rapidamente retomaram a predação das baratas. Neste grupo de animais, o estado de privação alimentar foi capaz de alterar a resposta diante do predador, assim como o padrão comportamental durante a predação, acarretando numa maior velocidade de captura e de ingestão das presas. Também foi observada, em alguns animais, a extinção da topografia seqüencial característica do comportamento de ratos que consomem baratas, e que normalmente é observada durante a etapa de ingestão. Estes animais executaram o comportamento predatório na maior parte do período de avaliação (*hunting*: 437.80 ± 31.63 seg; contato: 580.6 ± 35.75 seg *vs* outros: 59.60 ± 27.71 seg; *freezing*: 0.0 ± 0.0 seg; avaliação de risco: 0.0 ± 0.0 seg ; N= 5) (Figura 13). Comparado aos animais do grupo RxGxB, que também foram expostos ao gato e às baratas, o grupo RjxGxB 1 apresentou diferenças significativas nos parâmetros comportamentais associados à predação (tempo total de *hunting* e de contato; $P < 0.05$), assim como naqueles relacionados à resposta de defesa (*freezing* e avaliação de risco; $P < 0.05$) (Figura 13).

Entretanto, numa outra amostra de animais (RjxGxB 2; n= 5), a total privação de alimento por 72 horas não extinguiu a resposta de defesa diante do predador. Estes animais, inicialmente à introdução do gato, exploraram a gaiola, e rapidamente passaram a executar respostas de defesa. Em alguns casos raros, o rato cuidadosamente se arriscou em capturar uma presa. No entanto, bastou uma simples movimentação ou a vocalização do predador para que o animal substituísse a predação pelo congelamento motor. Portanto, neste grupo a análise quantitativa revelou o predomínio das respostas de defesa sobre os demais parâmetros avaliados (*freezing*: 681.0 ± 103.80 seg; avaliação de risco: 211.60 ± 58.16 seg *vs* *hunting*: 35.40 ± 21.69 seg; contato: 15.0 ± 13.52 seg; outros: 138.40 ± 39.82 seg ; N= 5) (Figura 13). Quando comparados ao grupo RxGxB, os animais do grupo RjxGxB2 não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros comportamentais associados à predação e à resposta

de defesa, porém este apresentou um aumento significativo de outros comportamentos, tais como atividades exploratórias, ingestão de água e autolimpeza (*RjxGxB2* outros: $138.40 \pm 39.82\text{seg}$ vs *RxGxB* outros: $1.00 \pm 1.00\text{ seg}$; $P<0.05$) (Figura 13).

Figura 13: Análise Comportamental de ratos expostos ao gato e às baratas. Foi mensurado o tempo total de *hunting*; de contato com as presas; em *freezing*; em avaliação de risco e o tempo total de execução de outros comportamentos; para os animais do grupo *RxGxB* (N= 5); do grupo *RjxGxB 1* que executaram a predação na presença do gato (N= 5); e do grupo *RjxGxB 2* que interromperam a predação na presença do gato (N= 5). Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. ■■■Diferenças significativas na análise do tempo total de *hunting* do grupo *RjxGxB 1*, comparado aos demais grupos, $P<0.001$; ***Diferenças significativas na análise do tempo total de contato com as presas do grupo *RjxGxB 1* comparado aos demais grupos, $P<0.001$; ♦♦♦Diferenças significativas na análise do tempo total de *freezing* do grupo *RjxGxB 1* comparado aos demais grupos, $P<0.001$; •Diferenças significativas na análise do tempo total de avaliação de risco do grupo *RjxGxB 1* comparado aos demais grupos, $P<0.05$; #Diferenças significativas na análise entre os grupos *RjxGxB* e *RjxGxB 2*, $P<0.05$.

Análise Imunohistoquímica da região do Colículo Superior

Os animais dos grupos experimentais que foram expostos ao predador natural, e que apresentaram respostas de defesa, apresentaram também similaridades na distribuição de Fos no CS, sendo observada uma maior densidade de imunomarcações para Fos no CSm (Figuras 14B, 15A-B e 15D). Entretanto, o grupo RjxGxB1, que se encontrava em restrição alimentar e também foi exposto ao gato, permaneceu caçando e ingerindo as presas na presença do predador. Os animais provenientes deste grupo apresentaram um padrão de imunorreatividade à Fos diferente dos demais, apresentando uma maior densidade de células marcadas no CSℓ (Figura 14C e 15C).

Figura 14: Fotodigital de secções transversais do encéfalo de ratos imunorreagidas para a quantificação de células marcadas para Fos. Uma grade de 0,09 mm² foi posicionada em sítios específicos do CSm e CSI (A). Distribuição de células imunorreativas à Fos no Cs de animais do grupo RxG (A), RxGxB (B) e RjxGxB1 (C). Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG); Aqueduto (AQ); Complexo Geniculado (MG).

Figura 15: Representação esquemática de secções transversais do encéfalo de ratos imunorreagidas para detecção de proteína Fos, ao nível do Colículo Superior (CS). Distribuição de células imunorreativas à Fos no CS de animais do grupo RxG (A), RxGxB (B) e RjxGxB1 (C) e RjxGxB2 (D).

No grupo RjxGxB 1 a análise da distribuição de células imunorreativas à Fos apresentou um padrão similar àquele apresentado no CS dos animais do grupo RxB (Figura 17), sendo a imunorreatividade à Fos do CSL desse grupo foi maior do que aquela encontrada no CSm (1088.9 ± 44.85 vs CSm: 182.22 ± 5.66 células/mm²) (Figura 16). O grupo RjxGxB2 apresentou um maior aumento de imunorreatividade a proteína Fos no CSm (Figura 16).

Figura 16: Os histogramas mostram a densidade de Fos em sítios específicos na camada intermediária das regiões mediais (CSm) e laterais (CSl) do Colículo Superior de ratos dos grupos RjxGxB1 e RjxGxB2. Os valores representam o número de células imunoreativas à Fos/mm². Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. *Diferenças significativas na análise entre as regiões CSm e CSl de cada grupo experimental, $P < 0.0001$. • Diferenças significativas na análise entre as regiões CSm e CSl de cada grupo experimental, $P = 0.0026$.

O grupo RjxGxB 1 apresentou um aumento significativo no número de células imunorreativas à Fos no CSL, quando comparado aos demais grupos (RjxGxB1: 1088.9 ± 44.85 vs RxB: 33.33 ± 3.51 ; RxG: 15.55 ± 2.72 ; RxB: 504.44 ± 17.77 células/mm² ; N= 5 ; $P < 0.001$) (Figura 17). No entanto, a distribuição de células imunorreativas à Fos no CSm se revelou ser significativamente inferior àquela encontrada nos grupos de animais que foram expostos ao gato (RjxGxB1: 182.22 ± 5.66 vs RxB: 266.67 ± 14.48 ; RxG: 382.22 ± 22.66 células/mm² ; N= 5 ; $P < 0.01$) (Figura 17).

Figura 17: Os histogramas mostram a densidade de Fos em sítios específicos da camada intermediária das regiões mediais (■) e laterais (□) do Colículo Superior de ratos dos grupos RjxGxB1 (N= 5) comparado aos demais grupos: RxG , RxB, RxGxB (N= 5/grupo). Os valores representam o número de células imunoreativas à Fos/mm². Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. ***Diferenças significativas na análise da região do CSℓ quando comparados aos demais grupos, $P < 0.001$. ••Diferenças significativas na análise da região do CSm quando comparado ao grupo RxGxB, $P \leq 0.01$. ■■Diferenças significativas na análise da região do CSm quando comparado ao grupo RxG, $P < 0.001$. **Diferenças significativas na análise da região do CSm quando comparados ao grupo RxB, $**P < 0.01$.

No que diz respeito aos dois grupos de animais que foram submetidos à restrição alimentar, além das diferenças apresentadas na execução do comportamento, esses animais também apresentaram no CS diferenças quanto à distribuição e ao número de células marcadas para a proteína Fos. Observamos um aumento significativo de imunorreatividade à Fos no CSm de animais do grupo RjxGxB 2 (RjxGxB 2: 411.11 ± 38.22 vs RjxGxB 1: 177.78 ± 4.53 células/mm², N= 4; $P = 0.0009$) (Figura 18). Da mesma forma, os animais do grupo RjxGxB1 apresentaram um maior número de células marcadas para Fos no CSℓ (RjxGxB1: 1066.7 ± 50.30 vs RjxGxB 2: 225.0 ± 37.78 células/mm²; N= 4; $P < 0.0001$) (Figura 18).

Figura 18: Densidade de Fos em sítios específicos nas regiões mediais (■) e laterais (□) do Colículo Superior de ratos dos grupos RjxGxB2 e RjxGxB1 (N= 4/grupo). Os valores representam o número de células imunoreativas à Fos/mm². Dados são apresentados como média ± erro padrão da média. ♦Diferenças significativas na análise do CSℓ entre os grupos, P<0.0001. *Diferenças significativas na análise do CSm entre os grupos, P=0.0009.

Análise Imunohistoquímica da região do Núcleo Pré-mamilar Dorsal do hipotálamo.

Sob uma análise qualitativa, animais que foram expostos ao gato, e eliciaram respostas de defesa apresentaram uma maior densidade de células imunorreativas à Fos no PMd (Figuras 19A, B e D; 20B e 21), de modo que o aumento de Fos nessa região foi semelhante entre os grupos. Ratos expostos apenas as baratas não apresentam Fos no PMd (Figura 20D). Entretanto, quando o grupo RjxGxB1, que predou na presença do gato, foi comparado com os demais grupos, este apresentou um pequeno aumento (Figura 19C) que foi significativamente inferior aos demais grupos (RjxGxB1: 356.25 ± 62.39 vs RjxGxB2: 1537.5 ± 244.63 células/mm², P<0.01; vs RxGxB: 1518.75 ± 62.39 células/mm², P<0.01; vs RxG: 1856.25 ± 160.52 células/mm², P<0.001) (Figura 21 e 22).

Figura 19: Representação esquemática de secções transversais do encéfalo de ratos ao nível do Núcleo Premamilar dorsal (PMd). A quantificação de células marcadas para Fos foi realizada com uma grade de 0,04 mm², posicionada no centro da estrutura, conforme está representado em C. Secção corada com tionina (E), e secções adjacentes apresentando a distribuição de células imunorreativas à Fos no PMd de animais do grupo RxG (A), RxGxB (B) e RjxGxB1 (C) e RjxGxB2 (D).

Figura 20: Fotodigital de secções transversais do encéfalo de ratos ao nível do PMd. Secção corada com tionina (A) e secção adjacente apresentando a distribuição de células imunoreativas à Fos (B) no PMd de rato exposto as presas e ao predador natural; (C) rato exposto ao predador natural, e (D) rato exposto somente as presas. (x100). fx: fórnix; V3: terceiro ventrículo.

Figura 21: Os histogramas mostram a densidade de Fos no PMd de ratos dos grupos RxG, RxGxB, RjxGxB 2 e RjxGxB 1 (N= 4/grupo). Os valores representam o número de células imunoreativas à Fos/mm². Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. *Diferenças significativa quando RjxGxB 1 foi comparado aos demais grupos, $P < 0.05$.

Resumidamente, a Figura 22 ilustra as densidades de proteína Fos nas regiões do CSm, CSI e PMd dos ratos que foram expostos as presas e ao predador natural (RxGxB) e dos animais em restrição alimentar que foram expostos as presas e ao predador natural (RjxGxB1 e RjxGxB2).

Figura 22: Os histogramas mostram a densidade de Fos no Csm, CSI e PMd de ratos dos grupos RxGxB, RjxGxB1 e RjxGxB2 (N= 4/grupo). Os valores representam o número de células imunoreativas à Fos/mm². Dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. *Diferenças significativa quando RjxGxB 1 foi comparado aos demais grupos, $P < 0.05$.

5. DISCUSSÃO.

Inicialmente faremos algumas considerações metodológicas sobre o uso da Proteína Fos como marcador de atividade neuronal e em seguida referentes aos experimentos de canulação e manipulação farmacológica do CS em animais expostos às presas e ao predador natural. Posteriormente faremos uma discussão mais ampla referente ao papel do CS nos comportamentos motivados relacionados as respostas defensiva e predatória.

5.1. Considerações Metodológicas sobre o uso da proteína Fos como marcador de atividade neuronal.

A associação dos dados comportamentais e neuroanatômicos obtidos em nosso estudo revelam que o CSm participa da resposta de defesa evocada por ratos que confrontam o predador natural. Animais que expressaram respostas de defesa diante de seu predador apresentaram um aumento da imunoreatividade à proteína Fos nas células do CSm, assim como no PMd e na PAGdl que são duas das estruturas do circuito neural envolvido com a resposta de defesa evocada pela presença de um predador natural (Canteras et.al, 1997; 1999; Comoli, et.al. 2003). Tal conclusão, a partir desta correlação de dados só é possível no atual momento, em virtude dos significativos avanços obtidos pela neurociência quando, há duas décadas, esta passou a utilizar Fos como uma ferramenta na identificação de neurônios ativados a partir de um estímulo neuronal (Dragunow & Robertson, 1987; Hunt *et al.*, 1987; Morgan *et al.*, 1987; Herrera e Robertson, 1996; Hoffman & Lyo, 2002). Além da habilidade para identificar o fenótipo de neurônios ativados, a imunodeteção da proteína Fos possui a vantagem de localizar somente as proteínas neuronais que são expressas até duas horas após o estímulo, tendo em vista que a proteína Fos possui uma meia-vida em torno de 90 minutos. Isto permite ao experimentador manusear o animal antes da eutanásia sem a preocupação de que tal manuseio proporcione a indução de genes de expressão imediata associados a estímulos inespecíficos ou ao estresse (Müller *et al.*, 1984; Morgan & Curran, 1991; Hoffman

et al., 1993). Assim, a detecção imunohistoquímica da proteína Fos no sistema nervoso central se estabeleceu como um importante marcador de atividade neuronal, podendo ser utilizada para mapear circuitos neurais (Dragunow e Robertson, 1988; Morgan *et al.*, 1988; Dragunow e Faull, 1989; Comoli e Canteras, 1998, 2000; Comoli *et al.*, 2005), em virtude de duas características funcionais importantes do gene *c-fos* que são os seus baixos níveis transcricionais apresentados sob condições basais (Hughes *et al.*, 1992) e a indutibilidade a partir de diversos estímulos (Kovács, 1998), e que foram capazes de proporcionar uma maior fidedignidade à técnica. Tais estímulos extrínsecos podem modular a função celular de diferentes maneiras, e uma delas seria através de mudanças na via de segundos mensageiros que são responsáveis por induzir, indiretamente, a expressão de genes específicos. A classe de genes ativados primariamente por sinais externos são classificados como genes de expressão imediata, e dentre eles está o gene *c-fos*, um proto-oncogene tendo como produto de sua expressão a fosfoproteína Fos, que desempenha um papel regulatório na função celular por codificar fatores de transcrição que modificarão a expressão de outros genes, conhecidos como genes alvos (Herrera & Robertson, 1996). A proteína Fos participa de um complexo de proteínas nucleares juntamente com a proteína Jun, formando um heterodímero que funcionará como um terceiro mensageiro, regulando o processo de transcrição (Morgan & Curran, 1989; 1991), e desta maneira desempenhando um papel como marcador de alterações na atividade neuronal.

Todavia devemos ressaltar que essa técnica sofre várias limitações, tendo em vista que a expressão da proteína Fos está relacionada apenas aos estímulos que, dependente da ativação de receptores de membrana ou canais iônicos dependente de voltagem, promovem aumento nos níveis intracelulares de segundos mensageiros como Cálcio e/ou AMPc (Sassone-Corsi *et al.*, 1988; Sheng *et al.*, 1990; Sheng e Greenberg, 1990).

Diversos estudos têm mostrado que independente do estímulo utilizado pra induzir ativação neural, alguns sítios do sistema nervoso central não expressam a proteína Fos

(Dragunow & Faull, 1989; Wisden *et al.*, 1990). Por outro lado, após um dado estímulo, os neurônios ativados que não expressam a proteína Fos podem utilizar outros fatores de transcrição, tais como *jun* e *krox*, ou nestas células os mensageiros intracelulares necessários para regular a expressão do gene *c-fos* podem não terem sido particularmente mobilizados (Sheng & Greenberg, 1990). Feitas essas ressalvas podemos discutir os resultados relativos à expressão da proteína Fos no cérebro de ratos durante a execução do comportamento predatório e defensivo em ratos.

5.2. Considerações metodológicas dos experimentos envolvendo manipulações farmacológicas.

Na tentativa de melhor compreender o papel do CS no processo de seleção comportamental, foram realizadas injeções do agonista GABAérgico, muscimol, no CSM de ratos e esses foram expostos às baratas e ao gato. Sob o ponto de vista do papel funcional do CS, esta etapa do nosso projeto se apresenta como uma das mais importantes, uma vez que os dados obtidos poderão trazer um maior esclarecimento a respeito de uma possível segregação funcional proposta às regiões medial e lateral do CS, e a sua influência no processo de seleção do comportamento (Dean *et al.*, 1989; Wang e Redgrave, 1997). Acreditávamos que o muscimol poderia bloquear a atividade do CSM e não haveria integração a respeito das informações referentes ao predador natural ao nível do CSM; o que poderia refletir na predominância da atividade do CSI mediante aos estímulos da barata e consequentemente o rato passaria a expressar a resposta de predação ao invés da resposta de defesa. Interessantemente isso não foi observado. Esses animais não apresentaram resposta predatória nessas circunstâncias, porém observamos que esses animais apresentam mudanças em seu comportamento no que diz respeito ao predador natural. Esses animais apresentam uma redução das respostas de congelamento motor e um aumento significativo

de atividades de exploração do ambiente experimental, o que reflete um desvio da atenção previamente direcionada ao predador para outros elementos do ambiente experimental.

Certamente tais resultados seriam mais marcantes se nossos animais estivessem sob efeito bilateral do muscimol na região do CSm. Inicialmente investimos meses realizando diversos experimentos em que os animais estavam canulados bilateralmente nessa região do CSm (n = 20), porém todos os dados comportamentais que obtivemos foram excluídos de nossas análises devido a questões histológicas observadas nesses animais, o que tornou nossos dados comportamentais não confiáveis com relação a qualquer efeito provocado pela injeção de muscimol ou salina. Todos os animais que foram bilateralmente canulados apresentaram uma compressão encefálica que foi observada inicialmente durante o procedimento cirúrgico de canulação. Posteriormente ao avaliar a histologia dos cérebros desses animais verificamos deformações na região do CSm. Acreditamos que tais deformações tenham sido provocadas durante a descida das duas cânulas, já que as forças exercidas pelas cânulas em dois pontos muito próximos (1.40 mm de distância) poderiam estar empurrando o parênquima colicular, ao invés de rompê-lo. Outra possibilidade é a de que as cânulas utilizadas em nosso protocolo, com diâmetro externo pequeno ($\varnothing = 0.5$ mm), possam estar carregando em sua ponta durante a descida, restos de tecido e sangue que podem dificultar o rompimento do parênquima colicular.

Outro fato dificultoso nos nossos experimentos de canulação bilateral é que o nosso alvo no CSm é muito próximo ao vaso longitudinal na superfície mediana do encéfalo; assim enfrentamos um fator que muitas vezes causa hemorragias e até mesmo a morte de animais ao longo da cirurgia ou no período de recuperação pós-cirúrgica. Geralmente as hemorragias ocorrem no momento em que a cânula é conduzida ao ponto de injeção, pois é quase inevitável que as cânulas, com um pequeno espaço de 1.40 mm entre elas, não esbarrem nas bordas do vaso, lesionando-o. Na tentativa de evitar a lesão do vaso durante a descida das

cânulas, sendo auxiliado por uma pinça de ponta fina, adotamos o procedimento de delicadamente comprimir as bordas do vaso e evitar o contato deste com as cânulas que foi muito positivo e reduziu a perda de animais, porém não permitiu solucionarmos os problemas referentes a deformação do encéfalo durante a descida da cânula e nem a compressão do CSm.

Devido a esses problemas que persistiram durante meses optamos por realizar experimentos com canulações unilaterais, o que resolveu o problema de deformação encefálica e compressão do CS e também permitiu uma análise e interpretação da possível participação do CS nos comportamentos motivados.

Uma vez feitas nossas considerações podemos discutir nossos resultados referentes ao comportamento e papel do CS em situações que os ratos foram expostos as presas e ao predador e também em situações de restrição alimentar e retornar a discussão referente ao efeito da inativação temporal do CS.

5.3. Papel do CS nos comportamentos motivados de resposta defensiva e predatória.

O colículo superior (CS), assim como o seu equivalente em não-mamíferos, o teto óptico, é bem conhecido por desempenhar um importante papel em mediar comportamentos relacionados à orientação aos estímulos exógenos. Estudos de cartografia neural no CS revelam a existência de mapas sensoriais, onde se observou uma correspondência entre os campos receptivos visuais, somatossensoriais e auditivos em diversas espécies [roedores: (Dräger e Hubel, 1975; 1976; Finlay, 1978), aves: (Knudsen, 1982) e répteis: (Gaither e Stein, 1979)]. Em mamíferos, sinais sensoriais multimodais capazes de eliciar movimentos de orientação convergem na camada profunda contralateral do CS, onde se encontram neurônios envolvidos na geração de movimentos dos olhos, cabeça, vibrissas e orelhas (Sparks, 1988). A localização dos campos receptivos destes neurônios varia sistematicamente

de acordo com a sua localização no CS. A subdivisão rostral do CS representa estímulos sensoriais provenientes da região frontal do animal, assim como aqueles estímulos provenientes da região oposta são representados na subdivisão caudal. As subdivisões mediais (CS_m) e laterais (CS_l) do CS também apresentam uma representação sensorial particular, uma vez que respondem a estímulos provenientes do campo visual superior e inferior, respectivamente (King, 2004). Sendo assim, o alinhamento dos mapas sensoriais oferece uma integração multisensorial importante para o processo de tomada de decisão e para o planejamento motor do comportamento adequado, que permitirá a aproximação ou o afastamento do animal de uma fonte de estímulo.

Estudos de estimulação elétrica no CS propõem uma divisão funcional entre as regiões medial e lateral que está relacionada à expressão de comportamentos de aproximação e de afastamento de um estímulo inesperado (Sahibzada et al. 1986; Dean et al. 1989). Dean et al. (1989) colocam como hipótese a existência de populações neuronais no CS que apresentam respostas diferenciadas aos diferentes estímulos visuais empregados. Por exemplo, foram identificados neurônios responsivos a objetos pequenos que se movimentam lentamente (Dräger e Hubel, 1975), onde tal estímulo, surgindo no campo visual superior do rato é capaz de eliciar congelamento motor (*freezing*) (Blanchard et al., 1981; Blanchard et al., 1986). Entretanto, o mesmo estímulo surgindo no campo visual inferior do animal elicia orientação e aproximação em direção ao objeto (Finlay et al., 1980). Esta análise sugere que a organização anatômica do CS permite que estímulos visuais inesperados sejam discriminados, e que suas projeções às regiões do tronco encefálico, medula espinhal e gânglios da base, são capazes de influenciar a seleção de comportamentos adaptativos (Dean et al., 1989; Comoli et al., 2003; Coizet et al., 2009).

Em estudos prévios através da imunodeteção da proteína Fos em encéfalos de rato, Comoli e Canteras (2000) identificaram o CS_l como um dos sítios encefálicos ativos durante

o comportamento de caçar baratas, e propuseram um possível circuito neural responsável por este comportamento. Posteriormente, lesionando-se bilateralmente o CSI com NMDA (N-METHIL-D-ASPARTIC ACID) os ratos apresentaram déficits comportamentais durante a predação, sugerindo que CSI seja um setor chave no comportamento predatório (Comoli e Canteras, 2000; Comoli 2002; Furigo et al., 2010). Sendo a região do CSI representativa do campo visual inferior, esses autores sugeriram que o CSI faz parte de um sistema de detecção da presença de objetos em movimento no ambiente, fundamental para a execução do comportamento predatório, podendo também exercer controle direto sobre movimentos oculares, orofaciais e dos membros dianteiros através de projeções descendentes. Ainda, dados recentes do nosso laboratório revelaram que o CSI é um importante integrador de informações sensoriais provenientes das vibrissas, e essas muito relevantes para a detecção da presa e no desempenho da captura (Comoli et al, 2009).

Uma vez que a proteína Fos ainda permanece como uma poderosa ferramenta na identificação de neurônios ativados (Kovács, 2008), os resultados obtidos em nosso laboratório a partir da imunodeteção de Fos no CS reforçam a idéia da existência de uma segregação funcional nesta estrutura. De acordo com os dados provenientes das análises histológica da distribuição de Fos no CS, associados àqueles do comportamento de ratos expostos às baratas e/ou ao predador, observamos uma forte relação entre a expressão de respostas de defesa diante do predador e uma maior imunorreatividade à Fos no CSm, enquanto que a execução do comportamento predatório parece ser dependente do CSI, já que lesões neste setor promovem um comprometimento na execução da caça predatória (Comoli e Canteras, 2000; Comoli 2002; Furigo et al., 2010). Ainda dados do nosso laboratório mostram déficits de orientação, detecção de presas e captura associados à redução da marcação de Fos no CSI (Comoli et al., 2009). Esta distinção anátomo-funcional observada a partir da relação entre o expressão do comportamento e o padrão de distribuição de células

imunorreativas à Fos no CS foi inicialmente observada em animais dos grupos RxB e RxG (Figura 8). Entretanto, no grupo RxGxB prevaleceu a resposta comportamental de defesa diante do predador em 100% dos animais analisados, indicando que nesta condição os estímulos provenientes do predador foram biologicamente mais significativos que a presença das presas. A análise histológica da distribuição de células marcadas para Fos no CS dos animais do grupo RxGxB revelou uma maior densidade de células marcadas no CSm, quando comparado ao CSℓ (Figura 16). Este padrão de distribuição das células marcadas no CS apresenta certa similaridade com o grupo RxG, que apresenta uma maior densidade no CSm (Figura 8).

O predomínio das respostas de defesa, e de uma maior imunoreatividade à Fos detectada no CSm de ratos expostos conjuntamente às baratas e ao gato, foram determinantes para a elaboração do protocolo de manipulação farmacológica, que teve por objetivo avaliar a influência do CSm na elaboração de respostas defensivas quando o rato se encontra diante de seu predador. Portanto, na tentativa de melhor avaliar o papel do CSm na resposta de defesa realizamos experimentos de inativação temporal do CS através da microinjeção de muscimol no CSm. Ao contrário do que imaginávamos não observamos resposta predatória nesses animais, porém observamos que esses animais apresentam mudanças em seu comportamento no que diz respeito ao predador natural. Esses animais apresentam uma redução das respostas de congelamento motor e um aumento significativo de atividades de exploração do ambiente experimental, o que reflete um desvio da atenção previamente direcionada ao predador, agora para outros elementos do ambiente experimental. É possível que o CSm tenha um papel importante no direcionamento de atenção à estímulos biologicamente relevantes e consequentemente que influencia a seleção de comportamentos apropriados em respostas a tais estímulos, ao nível dos gânglios da base (Comoli et al.2003; McHaffie et al., 2005). Nesse ponto é fundamental levarmos em

consideração dois fatores importantes: a inativação temporal foi unilateral, de modo que o CSm contralateral provavelmente está integrando normalmente os estímulos que ali chegam; e também a importância de outros estímulos sensoriais que são muito relevantes para a resposta de defesa, tais como estímulos olfativos que aparentemente não são integrados na região do CSm, mas sim em regiões hipotalâmicas conhecidas como sistema de defesa hipotalâmico o qual tem fortes relações com setores amigdalianos e hipocámpais relacionados com o processamento de informações do predador e do seu odor (Blanchard et.al, 2005). Essas respostas comportamentais são expressas de forma semelhante em todas as espécies de mamíferos (Blanchard et. al. 2001). A relação presa-predador entre roedores e gatos, que foi estabelecida durante a evolução destas espécies, selecionou os indivíduos que desenvolveram maior sensibilidade aos estímulos sensoriais provenientes de seu predador, e que foram capazes de elaborar estratégias comportamentais eficientes para a defesa e, portanto para uma melhor adaptação ao meio. Nos mamíferos macrosmáticos, como as espécies de roedores de laboratório, a olfação se apresenta como a principal modalidade sensorial para a detecção e possivelmente identificação do predador utilizando como as principais fontes de odor a pele, a urina, as fezes e as secreções de glândulas anais dos predadores (Apfelbach *et al.*, 2005). Estudos laboratoriais que expõem ratos ao seu predador ou ao seu odor demonstraram que tal condição é capaz de gerar uma redução, significativa e por período prolongado, na ocorrência de qualquer atividade locomotora e/ou comportamento não relacionado à resposta de defesa nestes animais (Blanchard e Blanchard, 1989a, 1989b; Dielenberg e McGregor, 2001; McGregor *et al.*, 2002; Hubbard *et al.*, 2004).

Nesse sentido pensamos em outra situação comportamental bastante crítica que provavelmente nos permitisse interpretações adicionais sobre o papel do CSm e que complementasse a idéia da importância do CSm na atenção voltada ao predador que evidenciamos com os experimentos de inativação unilateral do CSm com muscimol.

Quando observamos a resposta comportamental de ratos numa situação mais crítica envolvendo a ameaça de sobrevivência frente ao predador natural e também a ameaça de sobrevivência provocada pelo deficit de nutrientes consequente da restrição alimentar de 72 horas, verificamos que quando expostos às baratas e ao gato, 50% dos animais expressam respostas de predação (RjxGxB1) enquanto os outros 50% apresentam respostas de defesa ao predador (RjxGxB2).

De maneira interessante, observamos que os animais do grupo RxGxB1 mesmo diante do gato, um estímulo não-condicionado em ratos (Blanchard et al., 1975), permaneceram caçando e ingerindo as presas (Figura 13). No caso específico destes animais, a condição de privação alimentar provavelmente ofereceu um risco superior àquele proporcionado pelo predador, e desta forma o comportamento que melhor supriria as necessidades desse animal era o comportamento predatório. A distribuição de células marcadas para Fos no CS do grupo RxGxB1 revelou uma similaridade com a distribuição encontrada no grupo RxB, apesar dos animais em restrição alimentar terem apresentado no CSℓ uma maior densidade de células marcadas para Fos (Figuras 14C, 15C, 16 e 17). Neste grupo, a densidade de marcações apresentadas no CSm foi superior àquela apresentada em animais que foram expostos somente à presa e inferior aos grupos na presença do predador (Figura 17), o que sugere que esses animais parecem não estar com atenção tão voltada ao predador. Diferentemente, os animais do grupo RxGxB2 apresentaram o congelamento motor diante do gato, mantendo a resposta clássica diante de um estímulo não-condicionado (Figura 13). Ainda, estes animais apresentaram um padrão de marcação para Fos no CS similar àquele encontrado nos grupos de animais que apresentaram resposta de defesa diante do gato (Figura 14D, 15D, 16 e 17). Para esses animais o estímulo do predador foi mais importante; e sabidamente processado no CSm, de modo que a atenção foi completamente voltada para o predador e a resposta de defesa foi manifestada como a mais apropriada. Por fim, os dados além de revelarem o padrão de atividade no CS nas duas situações conflituosas de animais

em restrição alimentar de 72 horas, propõem a existência de regiões funcionalmente no CS, mais envolvidas na expressão de comportamentos distintos, como é o caso da predação e das respostas de defesa. Interessantemente, em associação a esses dados coliculares notamos uma maior mobilização de setores, em especial o núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo na circunstância em que o rato privado de comida responde ao predador e deixa de preda as baratas.

Achamos bastante interessante o fato de 50% dos animais em restrição apresentarem resposta de predação e 50% apresentarem respostas de defesa e resolvemos avaliar estruturas que compõem o circuito hipotalâmico de defesa e que certamente integram respostas olfativas e feromonais, tais como o núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) que é sabidamente ativo durante as respostas de defesa expressas na presença do predador natural ou mediante a exposição à urina do gato.

Em paralelo ao atual conhecimento a respeito do papel do PMd nas resposta de ratos diante do predador, nossos dados obtidos a partir da análise da densidade de marcações no PMd dos diversos grupos analisados mostra (conforme dados de literatura) uma estreita relação entre uma maior atividade do PMd e a execução de respostas de defesa. Os grupos de animais que foram expostos ao gato e as baratas, e que apresentaram respostas de defesa também apresentaram semelhante densidade de marcações no PMd. Entretanto, diferenças significativas foram observadas quando comparados ao grupo de animais que predou na presença do gato, uma vez que os animais deste grupo apresentaram uma baixa densidade de marcação de proteína Fos no PMd (Figuras 19, 21 e 22).

É bem descrito na literatura que a resposta defensiva de ratos diante do predador é fortemente associada à expressão da proteína Fos no núcleo pré-mamilar dorsal (PMd), uma estrutura-chave na execução de uma resposta inata a uma ameaça ambiental, como a presença de um predador (Canteras et al., 1997; Canteras et al., 2001; Canteras, 2002).

Respostas comportamentais, tais como: congelamento motor (*freezing*) e/ou respostas de escape (*flight*) são reduzidas em ratos expostos ao predador, e que apresentam lesões no PMd (Markham et al., 2004). Dicas feromonais e o odor proveniente do predador, recebidos pelo núcleos medial da amígdala, assim como as dicas contextuais do predador que são processadas no hipocampo, são transmitidas ao circuito da zona medial do hipotálamo, que apresenta como via fugal o PMd (Cezario et al., 2008). As informações processadas e transmitidas pelo PMd ao núcleo anteromedial do tálamo, parte ventral (AMv) e à substância cinzenta periaquedutal, parte dorsolateral (PAGdl) exercerá influência, respectivamente no processamento mnemônico e atencional, e na execução de respostas comportamentais condicionadas e não-condicionadas que são dependentes da PAG (Cezario et al., 2008). Portanto, o PMd exerce um papel fundamental não só na execução de uma resposta adequada quando o animal encontra-se diante do predador, mas também na execução antecipada de uma resposta ao reencontrar tais dicas ambientais.

Uma riqueza de dados surgidos a partir de nossos estudos neuroanatômicos, comportamentais e de manipulação farmacológica coloca o CS como uma estrutura importante no processo de seleção do comportamento. O CSI através de suas projeções ao núcleo parafascicular do tálamo poderia exercer influência sobre a atividade de neurônios do estriado ventrolateral (Berendse e Groenewegen, 1990; Krout et al., 2001), que é uma estrutura fundamental na implementação da sequência motora desempenhada por ratos durante a captura e o manuseio das presas (dos Santos et al., 2007). Estas conexões, em conjunto com o circuito estriato-nigro-tectal formam uma das alças subcorticais dos gânglios da base, que é o circuito o qual se atribui grande importância para a seleção do comportamento (Redgrave et al., 1999). Desta maneira, o CS assume uma posição importante no processo de seleção e de reforço comportamental, por desempenhar influência direta na atividade de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo ventral (Comoli et al., 2003). Da

mesma forma o CS também apresenta alças anatômicas que podem estar funcionalmente ativas e envolvidas no processo de seleção comportamental ao nível dos gânglios da base através dos núcleos talâmicos intralaminares ou através de sua influência direta nos neurônios dopaminérgicos do mesencefalo ventral. O CS apresenta projeções topograficamente organizadas para a substância negra pars compacta (SNc), de modo que setores laterais do CS projetam-se para setores dorsolaterais da SNc, e setores mediais do CS projetam-se para setores ventromediais da SNc (Comoli et al, 2003).

Dados de literatura dão suporte aos nossos dados comportamentais referentes ao envolvimento do CSm no comportamento defensivo uma vez que a estimulação desta região foi capaz de eliciar respostas comportamentais de defesa (Northmore et al., 1988; Sahibzada et al., 1986), assim como respostas autonômicas que dão suporte a tal comportamento (Keay et al., 1988; 1990).

Acreditamos que inicialmente o CSm esteja fortemente relacionado ao direcionamento de atenção a estímulos salientes através das alças funcionais com os gânglios da base, mas acreditamos também que o sistema colicular interage com outros sistemas tais como o circuito de defesa hipotalâmico.

É plausível que o sistema hipotalâmico de defesa interaja com o CSm e possa efetuar modulações assim como certamente o CSm também influencia esse sistema, porém maiores investigações são necessárias para um melhor entendimento das influências do CSm sob o circuito hipotalâmico de defesa.

Dados de literatura relatam a existência de projeções do CSm ao núcleo supragenículado (Furigo et al., 2010) que se apresentam como uma via de condução de estímulos provenientes do campo visual superior para o núcleo lateral da amígdala, que é

um sítio responsivo a presença do predador, e onde ocorre a integração de informações visuais e auditivas provenientes do córtex (Canteras, 2002).

Os nossos dados anátomo-funcionais sugerem fortemente que o CS interfere no circuito neural hipotalâmico relacionado à resposta de defesa ao predador de modo que esse circuito fica menos ativo, dadas as nossas observações referentes aos animais em restrição alimentar que continuaram a predação insetos mesmo na presença do predador enquanto apresentaram diminuição da atividade no PMd, em contraposição aos animais que interromperam a predação e entraram em congelamento motor, e que apresentaram grande atividade do PMd. Entretanto, maiores investigações são necessárias para um melhor entendimento de que sítios neurais intermedeiam o sistema colicular e o circuito hipotalâmico da defesa.

Ao nível da PAG, observamos, em estudos do nosso laboratório, que o CSI ainda recebe projeções das porções rostrais da coluna ventrolateral da PAG (PAGvl), setor que está marcado com Fos durante a predação e que sugerimos enviar projeções inibitórias para a PAGdl (Comoli et.al, '03). Ainda setores mais dorsais PAGdl que sabidamente estão envolvidos na resposta de defesa na presença do predador natural (Aguiar e Guimarães, '09; Braga et al., '09; Lima et al., '08; Comoli et al. '03; Canteras e Goto, '99) também projetam-se para o CSI. Sugerimos que a PAGdl possa exercer efeito excitatório diretamente nas porções mediais do CS reforçando a atenção voltada ao predador natural e consequentemente influenciando a resposta defensiva, enquanto poderia exercer efeito inibitório diretamente sobre as porções laterais do CS, de modo a inibir ou modular o comportamento predatório na situação em que o rato é exposto a ambas situações conjuntamente, como observamos em nossos experimentos comportamentais (RxGxB). As projeções da PAGvl poderia exercer efeito excitatório diretamente sobre as porções laterais do CS e efeito inibitório sobre as porções mediais do CS indiretamente através da inibição da PAGdl e com isso desviar a

atenção do predador e conseqüentemente reforçar o comportamento predatório direcionando a atenção ao campo visual inferior onde se encontram as presas, como observamos em nossos experimentos em que os ratos estavam em restrição alimentar e foram expostos ao predador e as presas conjuntamente (RjxGxB1).

Por fim, acreditamos que neste momento temos novos elementos e fortemente sugestivos com relação ao papel do CS nos comportamentos motivados.

6. CONCLUSÃO

Sugerimos que o CSm é um sítio muito importante na integração de informações referentes à atenção voltada ao predador e que deve exercer um papel no processo de seleção comportamental ao nível dos gânglios da base. Ainda sugerimos que existe uma interação importante entre os sistema colicular e o sistema hipotalâmico de defesa.

7. REFERÊNCIAS

- AGUIAR DC. & GUIMARÃES FS. Blockage of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. 2009; *Journal of Neuroscience Research*, 87: 2418-2429.
- APFELBACH R., BLANCHARD D.C., BLANCHARD R.J. HAYES R.A. & MCGREGOR M.S. The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. 2005; *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 29: 1123-1144.
- BERENDSE H.W. & GROENEWEGEN H.J. Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. 1990; *J Comp Neurol* 299:187-228.
- BLANCHARD R.J., MAST M. & BLANCHARD D.C. Stimulus control of defensive reactions in the albino rat. 1975; *J Comp Physiol Psychol*. Jan;88(1):81-8.
- BLANCHARD D.C., BLANCHARD R.J., LEE M.C. & WILLIAMS G. Taming in the wild Norway rat following lesions in the basal ganglia. 1981; *Physiol Behav*. Dec;27(6):995-1000.
- BLANCHARD R.J., FLANNELLY K.J. & BLANCHARD D.C. Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. 1986; *J Comp Psychol*. Jun;100(2):101-7.
- BLANCHARD R.J., YANG M., LI C.I., GERVACIO A. & BLANCHARD D. C. Cue and context conditioning of defensive behavior to cat odor stimuli. 2001; *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25: 587-595.
- BLANCHARD R.J. & BLANCHARD D.C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. 1989b; *Journal of Comparative Psychology*, 103 (1): 70-82.
- BLANCHARD D. C., CANTERAS N. S., MARKHAM D. C. M., PENTKOWSKI N. S. & BLANCHARD R.J. lesions of structures showing fos expression to cat presentation: Effects on responsivity to a cat, cat odor, and nonpredator threat. 2005; *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29: 1243-1253.
- BLANCHARD D.C. & BLANCHARD R.J. Defensive behaviors, fear, and anxiety. In handbook of behavioral neuroscience, Volume 17, Handbook of anxiety and fear. Ed. R.J. BLANCHARD, D.C. BLANCHARD, G. GRIEBEL and D. NUTT, 2008; Academic Press. 63-80 pp.
- BOEHNKE SE, MUNOZ DP (2008) On the importance of the transient visual response on the superior colliculus. *Curr Opin Neurobiol* 18:1-8.
- BOLAM J.P. Preparation of central nervous system tissue for light and electron microscopy. In: Experimental Neuroanatomy: a practical approach. Ed. J.P. Bolam, 1992; The Practical Approach Series. Oxford University Press, pp. 1-29.
- BRAGA AA., AGUIAR DC. & GUIMARÃES FS. (2009) NOC-9, a selective nitric oxide donor, induces flight reactions in the dorsolateral periaqueductal gray of rats by activating soluble guanylate cyclase. *Neuroscience Letters* 459:79-83.
- BRANDÃO ML, CARDOSO SH, MELO LL MOTTA V, COIMBRA NC (1994) Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neurosc Behav Rev* 18(3):339-346.
- BRANDÃO ML, ANSEOLI VZ, PANDÓSSIO JE, ARAÚJO JE, CASTILHO VM (1999) Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosc Biobehav Rev* 23(6): 863-875

- BURNETT L. R., STEIN B. E., CHAPONIS D. & WALLACE M. T. Superior colliculus lesions preferentially disrupt multisensory orientation. 2004; *Neuroscience*, 124: 535-547.
- CANTERAS N. S., & SWANSON L. W. The dorsal premammillary nucleus: An unusual component of the mammillary body. 1992; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89: 10089-10093.
- CANTERAS N. S., CHIAVEGATTO S., RIBEIRO DO VALLE L. E. & SWANSON L. W. Severe reduction of rat defensive behavior to a Predator by discrete hypothalamic chemical lesions. 1997; *Brain Research Bulletin*, 44: 297-305.
- CANTERAS N.S., RIBEIRO-BARBOSA É.R. & COMOLI E. Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. 2001; *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25: 661-8.
- CANTERAS N.S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. 2002; *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 71 (3): 479-489.
- CANTERAS N. S., KROON J. A.V. , DO-MONTE F. H.M., PAVESI E. & CAROBREZ A. P. Sensing danger through the olfactory system: The role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. 2008; *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32: 1228-1235.
- CANTERAS NS , GOTO M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal Gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport* 10(2): 413-418.
- 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. 2008; *Eur J Neurosci. Sep*;28(5):1003-15.
- COIZET V., COMOLI E., WESTBY G.W.M. & REDGRAVE P. Phasic activation of substantia nigra and the ventral tegmental area by chemical stimulation of the superior colliculus: an electrophysiological investigation in the rat. 2003; *The European Journal of Neuroscience*, 17: 28-40.
- COIZET V., GRAHAM J.H., MOSS J., BOLAM J.P., SAVASTA M., MCHAFFIE J.G., REDGRAVE P. & OVERTON P.G. Short-latency visual input to the subthalamic nucleus is provided by the midbrain superior colliculus. 2009; *J Neurosci. Apr* 29;29(17):5701-9.
- COMOLI E. & CANTERAS N.S. Lateralmost region of intermediate layer of superior colliculus: a key site involved in the motor control of predatory hunting. 2000; Abstract 847.5 in *Society for Neuroscience's 30th Annual Meeting*.
- COMOLI E., COIZET V., BOYES J., BOLAM J.P., CANTERAS N.S., QUIRK R.H., OVERTON P.G. & REDGRAVE P. 2003; A direct projection from superior colliculus to substantia nigra for detecting salient visual events. 2003; *Nature Neuroscience*, 6: 74-80.
- COMOLI E. CEDRAZ-MERCEZ PL. Involvement of Superior Colliculus in selecting behavioral responses in rats while in a conflicting and stressfull context. 12th International Conference on Neuroscience and Biological Psychiatry "Stress and Behavior" and 2nd international Stress and Behavior Society Congress. St. Petersburg, Russia, 2009
- COMOLI E., RIBEIRO-BARBOSA É.R., NEGRÃO N., GOTO M. & CANTERAS N.S. Functional mapping of the prosencephalic systems involved in organizing predatory hunting in rats. 2005; *Neuroscience*, 130: 1055-1067.
- DEAN P., REDGRAVE P. & WESTBY G.W.M. Event or emergency? Two responses systems in the mammalian superior colliculus. 1989; *Trends in Neuroscience*, 12: 137-147.

- DEAN P. & REDGRAVE P. Behavioural consequences of manipulating GABA neurotransmission in the superior colliculus. 1992; *Progress in brain research*, 90: 263-281.
- DEAN P. & REDGRAVE P. Superior colliculus and visual neglect in rat and hamster: I. Behavioural evidence. 1984a; *Brain Research*, 320(2-3):155-63.
- DEAN P. & REDGRAVE P. Superior colliculus and visual neglect in rat and hamster: II. Possible mechanisms. 1984b; *Brain Research*, 320(2-3):143-153.
- DEAN P. & REDGRAVE P. Superior colliculus and visual neglect in rat and hamster: III. Functional implications. 1984c; *Brain Research*, 320(2-3):129-141.
- DEAN P., MITCHELL I.J. & REDGRAVE P. Responses resembling defensive behaviour produced by microinjection of glutamate into superior colliculus of rats. 1988; *Neuroscience*, 24: 501-510.
- DIELENBERG R.A. & MCGREGOR I.S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. 2001; *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 25: 597-609.
- DOS SANTOS L.M., FERRO M.M., MOTA-ORTIZ S.R., BALDO M.V., DA CUNHA C. & CANTERAS N.S. Effects of ventrolateral striatal inactivation on predatory hunting. 2007; *Physiol Behav.* Mar 16;90(4):669-73.
- DRÄGER U.C. & HUBEL D.H. Responses to visual stimulation and relationship between visual, auditory, and somatosensory inputs in mouse superior colliculus. 1975; *J Neurophysiol.* May;38(3):690-713.
- DRÄGER U.C. & HUBEL D.H. (1976) Topography of visual and somatosensory projections To mouse superior colliculus . *J. Neurophysiol* 39(1)91-101.
- DRAGUNOW M. & ROBERTSON H. A. Brain injury induces c-fos protein(s) nerve and glial-like cells in adult mammalian brain. 1988; *Brain Research*, 455:295-299.
- DRAGUNOW M. & ROBERTSON H. A. Generalized seizures induce c-Fos protein(s) in mammalian neurons. 1987; *Neuroscience Letter*, 82: 157-161.
- EISENBERG J.F. & LEYHAUSEN P. The phylogenesis of predatory behavior in mammals. 1972; *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 30: 50-93.
- EWERT JP, BUXBAUM-CONRAD H, GLASGOW M, RÖTTGEN A, SCHÜRG-PFEIFFER E. SCHWIPPERT WW. (1999) forebrain and midbrain structures involved in prey-catching behavior of toads: stimulus-response mediating circuits and their modulating loops. *Eur J. Morphol* 37(2-3): 172-6.
- ERRO E., LANCIEGO J.L. & GIMÉNEZ-AMAYAL J.M. Relationships between thalamostriatal neurons and pedunculopontine projections to the thalamus: a neuroanatomical tract-tracing study in the rat. 1999; *Experimental Brain Research*, 127:162-170.
- FELSEN G, MAINEN ZF (2008) Neural substrates of sensory-guided locomotor, decisions in the rat superior colliculus , *Neuron* 60: 137-148.
- FINLAY B.L., SCHNEPS S.E., WILSON K.G. & SCHNEIDER G.E. Topography of visual and somatosensory projections to the superior colliculus of the golden hamster. 1978; *Brain Res.* Feb 24;142(2):223-35.
- FINLAY B.L., SENGELAUB D.R., BERG A.T. & CAIRNS SJ. A neuroethological approach to hamster vision. 1980; *Behav Brain Res.* Dec;1(6):479-96.

- FOX C.H., JOHNSON F.B., WHITING J. & ROLLER P.P. Formaldehyde fixation. 1985; *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33; 8: 845-853.
- FURIGO I.C., DE OLIVEIRA W.F., DE OLIVEIRA A.R., COMOLI E., BALDO M.V., MOTA-ORTIZ S.R. & CANTERAS N.S. The role of the superior colliculus in predatory hunting. *Neuroscience*. 2010 Jan 13;165(1):1-15. Epub 2009 Oct 12.
- GAITHER N. S. & STEIN B. E. Reptiles and mammals use similar sensory organizations in the midbrain. 1979; *Science*, 205: 595-597.
- GRANTYN R (1988) Gaze control through superior colliculus structure and function. In *Neuroanatomy of the oculomotor system* (Buttner-Ennever. JA, Ed),pp. 273-333, Elsevier.
- GROBSTEIN P (1988) Between the retinotectal projection and directed movement: topography of a sensorimotor interface. *Brain Behav Evol* 31:34-48.
- HELMET ME, KELLER A (2007) Superior sensation: superior colliculus participation in rat vibrissa system. *BMC Neurosci*. 8:12.
- HERRERA D. G. & ROBERTSON H. A. Activation of c-fos in the brain. 1996; *Progress in neurobiology*, 50: 83-107.,
- HOFFMAN G. E. & LYO D. Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? 2002; *Journal of Neuroendocrinology*, 14:259-268.
- HOFFMAN G. E., SMITH M. S. & VERBALIS J. G. c-fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. 1993; *Frontiers in Neuroendocrinology*, 14: 173-213.
- HUBBARD D.T., BLANCHARD D.C., YANG M., MARKHAM C.M., GERVACIO A., CHUN-I L. & BLANCHARD R.J. Development of defensive behavior and conditioning to cat odor in the rat. 2004; *Physiology and Behavior*, 80: 525– 530.
- HUERTA M.F., FRANKFURTER A. & HARTING J.K. Studies of the principal sensory and spinal trigeminal nuclei of the rat: projections to the superior colliculus, inferior olive, and cerebellum. 1983; *The Journal Comparative Neurology*, 220(2):147-67.
- HUERTA M.F., FRANKFURTER A. & HARTING J.K. et al (1983) Studies of the principal sensory and spinal trigeminal nuclei of the rat: projections to the superior colliculus, inferior olive, and cerebellum. *J Comp Neurol* 220(2):147-67.
- HUGHES P., LAWLOR P. & DRAGUNOW M. Basal expression of Fos, Fos-related Jun and Krox 13 proteins in rat hippocampus. 1992; *Molecular Brain Research*, 02: 244-246.
- HUNT S. P., PIN A. & EVA G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. 1987; *Nature* 32: 632-634.
- ITOH K., KONISHI A., NOMURA S., MIZUNO N., NAKAMURA Y. & SUGIMOTO T. Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. 1979; *Brain Research*, 175: 341-346.
- JÜCH P.J. & ROKX J.T. Efferent projections of the parvocellular reticular nucleus to the mesencephalic trigeminal nucleus in rat. 1988; *Brain Research*, 462(1):185-189.
- KEAY K.A., REDGRAVE P. & DEAN P. Cardiovascular and respiratory changes elicited by stimulation of rat superior colliculus. 1988; *Brain Res Bull*. Jan;20(1):13-26.

- KEAY K.A., DEAN P. & REDGRAVE P. N-methyl D-aspartate (NMDA) evoked changes in blood pressure and heart rate from the rat superior colliculus. 1990; *Exp Brain Res.* 80(1):148-56.
- KIERNAN J.A. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what are they and what are do. 2000; *Microscopy Today*, 00-01: 8-12.
- KILLACKEY H. P. & ERZURUMLU R. S. Trigeminal projections to the superior colliculus of the rat. 1981; *Journal Comparative Neurology*, 201(2):221-42.
- KING A.J. The superior colliculus. 2004; *Curr Biol.* May 4;14(9):R335-8.
- KNUDSEN E.I. Auditory and visual maps of space in the optic tectum of the owl. 1982; *Journal of Neuroscience.* Sep;2(9):1177-94.
- KOLMAC C.I., POWER B.D. & MITROFANIS J. Patterns of connections between zona incerta and brainstem in rats. 1998; *The Journal Comparative Neurology*, 396(4):544-55.
- KOVÁCS K.J. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. 2008; *J Neuroendocrinol.* Jun; 20(6):665-72.
- KROUT K.E., LOEWY A.D., WESTBY G.W.M. & REDGRAVE P. Superior Colliculus Projections to Midline and Intralaminar Thalamic Nuclei of the Rat. 2001; *The Journal of Comparative Neurology* 431:198-216.
- LEYHAUSEN P. On the function of relative hierarchy of moods (shown by the example of the phylogenetic and ontogenetic development of predatory behavior in beasts of prey). 1965; *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 22(4):412-94.
- LI Y., TAKADA M., KANEKO T. & MIZUNO N. Premotor neurons for trigeminal motor nucleus neurons innervating the jaw-closing and jaw-opening muscles: differential distribution in the lower brainstem of the rat. 1995; *The Journal of Comparative Neurology*, 356: 563-579.
- MARKHAM C.M., BLANCHARD D.C., CANTERAS N.S., CUYNO C.D. & BLANCHARD R.J. Modulation of predatory odor processing following lesions to the dorsal premammillary nucleus. 2004 *Neurosci Lett.* Nov 30;372(1-2):22-6.
- MAY PJ. The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. **Prog Brain Res.** 151:321-78, 2006.
- MCGREGOR I.S., SCHRAMA L., AMBERMOON P. & DIELENBERG R.A. Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats. 2002; *Behavioural Brain Research.* 129(1-2):1-16.
- MCHAFFIE J.G., STANFORD T.R., STEIN B.E., COIZET V. & REDGRAVE P. Subcortical loops through the basal ganglia. 2005; *Trends in Neuroscience*, 28 (8): 401-407.
- MOGOSEANU D., SMITH A.D. & BOLAM P.J. Monosynaptic innervation of trigeminal motor neurones involved in mastication by neurones of the parvocellular reticular formation. 1993; *The Journal Comparative Neurology*, 336(1):53-65
- MORGAN JI, CURRAN T. In: Psychopharmacology – the fourth generation of progress. Bloom FE, Kupfer DJ, Nova Iorque: Raven Press, 631-42, 1995.

- MORGAN JI, CURRAN T Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. **Ann Rev Neurosci.** 14:421-51, 1991.
- MOYER KE. Kinds of aggression and their physiological basis. **Commun Behav Biol, Part A.** 2: 65-87, 1968.
- MULLER R., BRAVO R., BUCKHARDT J. & CURRAN T. Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. 1984; *Nature*, 312: 716-720.
- MUNOZ DP, GUITTON D (1989) Fixation and orientation control by the tecto-reticulo-spinal system in the cat whose head is unrestrained. *Rev Neurol (Paris)* 145: 567-579.
- NEGRÃO N. & SCHMIDEK W. Individual differences in the behavior of rats (*Rattus norvegicus*). 1987; *Journal of Comparative Psychology*, 101: 107-111.
- NEWMAN G.R., JASANI B. & WILLIAMS E.D. Metal compound intensification of the electron-density of diaminobenzidine. 1983; *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 13; 12: 1430-1434.
- NORTHMORE D.P., LEVINE E.S. & SCHNEIDER G.E. Behavior evoked by electrical stimulation of the hamster superior colliculus. 1988; *Exp Brain Res.* 73(3):595-605.
- PAXINOS G. & WATSON C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Sixth Edition. 2007; Academic Press.
- REDGRAVE P., MITCHELL I.J. & DEAN P. Descending projections from the superior colliculus in rat: a study using orthograde transport of wheatgerm-agglutinin conjugated horseradish peroxidase. 1987; *Experimental Brain Research*, 68(1): 147-167.
- REDGRAVE P., ODEKUNLE A. & DEAN P. Tectal cells of origin of predorsal bundle in rat: location and segregation from ipsilateral descending pathway. 1986; *Experimental Brain Research*, 63(2):279-93.
- REDGRAVE P., WESTBY G.W. & DEAN P. Functional architecture of rodent superior colliculus: relevance of multiple output channels. 1993; *Progress in Brain Research*, 95: 69-77.
- SAHIBZADA N., DEAN P. & REDGRAVE P. Movements resembling orientation or avoidance elicited by electrical stimulation of the superior colliculus in rats. 1986; *J Neurosci.* 986 Mar;6(3):723-33.
- SASSONE-CORSI, P., SISSON, J. C., VERMA, I.M. Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. 1988; *Nature*, 334: 314-19.
- SCHENBERG L.C., PÓVOA, R.M.F., COSTA A.L.P., CALDELLAS A.V., TUFIK S. & BITTENCOURT A.S. Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. 2005; *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29: 1279-1298.
- SHAMMAH-LAGNADO S.J., ALHEID G.F. & HEIMER L. Afferent connections of the interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure and adjacent amygdalostratial transition area in the rat. 1999; *Neuroscience*, 94: 1097-1123.
- SHENG, M. & GREENBERG, M. E. 1990 The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. 1990; *Neuron*, 4: 477-485.
- SHENG, M., MCFADDEN, C., & GREENBERG, M. E. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. 1990; *Neuron*, 4: 486-490.

- SHU S., JU G. & FAN J. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. 1988; *Neuroscience Letters*, 85: 169-171.
- SPARKS DL. Neural cartography: sensory and motor maps in the superior colliculus. 1988; *Brain Behav Evol.* 31(1):49-56.
- STEIN B. E. Organization of the rodent superior colliculus: some comparisons with other mammals. 1981; *Behavioural Brain Research*. 3: 175-178
- STEINER H, HUSTON JP (1992) Control of behavior under apomorphine by sensory input from the face. *Psychopharmacol (Berl)* 109(4):390-394.
- TAN T.C. & BLACK P.M. Sir Victor Horsley (1857-1916): pioneer of neurological surgery. *Neurosurgery*. 2002 Mar;50(3):607-11; discussion 611-2.
- VARGAS LC, MARQUES TA, SCHENBERG LC. Micturition and defensive behaviors are controlled by distinct neural networks within the dorsal periaqueductal gray and deep gray layer of the superior colliculus of the rat. **Neurosci Lett.** 280(1):45-8, 2000.
- VAN DER WERF Y.D., WITTER M.P. & GROENEWEGER H.J. The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. 2002; *Brain Research. Brain Research Reviews*, 39:107-140.
- VIDYASAGAR TR. Possible plasticity in the rat superior colliculus. **Nature.** 14;275(5676):140-1, 1978.
- YASUI Y., TSUMORI T., ANDO A. & DOMOTO T. Demonstration of axon collateral projections from the substantia nigra pars reticulata to the superior colliculus and the parvocellular reticular formation in the rat. 1995; *Brain Research*, 674: 122-126.
- YASUI Y., TSUMORI T., ANDO A., DOMOTO T., KAYAHARA T. & NAKANO K. Descending projections from the superior colliculus to the reticular formation around the motor trigeminal nucleus and the parvocellular reticular formation of the medulla oblongata in the rat. 1994; *Brain Research*, 656: 420-426.
- WALESZCZYK W. J., WANG C., BENEDEK G., BURKE W. & DREHER B. Motion sensitivity in cat's superior colliculus: contribution of different visual processing channels to response properties of collicular neurons. 2004; *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 2004, 64: 209-228.
- WANG S. & REDGRAVE P. Microinjections of muscimol into lateral superior colliculus disrupt orienting and oral movements in the formalin model of pain. 1997; *Neuroscience*. Dec;81(4):967-88.
- WELZL H, SCHWARTING R, KULAJTA J, Huston JP (1984) Perioral biting and turning after intranigral injection of a GABA- or met-enkephalin-agonist: role of the thalamus and superior colliculus. *Exp Brain Res* 55:438-444.
- WHISHAW, I. Q., CIOE, J. D. D., PREVISICH, N. & KOLB, B. The variability of the interaural line vs the stability of bregma in rat stereotaxic surgery. 1977; *Physiol. Behav.* 19, 719-722.
- WISDEN, W., ERRINGTON, M. L., WILLIAMS, S., DUNNETT, S. B. & WATERS, C. Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. 1990; *Neuron*, 4: 603-614.
- WURTZ RH (1996) Vision for the control of movement. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 11:2130-2145.