RODRIGO DE ANDRADE RUFINO

**Investigação da Substância Cinzenta
Periaquedutal (PAG) na Organização das
Respostas de Defesa Frente ao Predador**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

Rodrigo de Andrade Rufino

**Investigação da Substância Cinzenta
Periaquedutal (PAG) na Organização das
Respostas de Defesa Frente ao Predador**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Newton Sabino Canteras

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Rufino, Rodrigo de Andrade.

Investigação da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na organização das respostas de defesa frente ao predador / Rodrigo de Andrade Rufino. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Newton Sabino Canteras.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Análise hodológica, neuroquímica e funcional dos sistemas neurais envolvidos na organização dos comportamentos motivados.

Versão do título para o inglês: Investigation of periaqueductal gray (PAG) in the organization of the defense responses front predator.

1. Substância cinzenta periaquedutal 2. Comportamento de defesa 3. Avaliação de risco 4. Septo lateral 5. Núcleo hipotalâmico anterior 6. Predador I. Canteras, Prof. Dr. Newton Sabino II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0187/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rodrigo de Andrade Rufino.

Título da Dissertação: Investigação da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na organização das respostas de defesa frente ao predador.

Orientador(a): Prof. Dr. Newton Sabino Canteras.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 –e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	--

Decl. CEUA.011/2014.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 085/12/CEUA, datado de 24.08.12, e por solicitação do Prof. Dr. **Newton Sabino Canteras**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno **Rodrigo de Andrade Rufino** ao Projeto de Pesquisa "*Bases Neurais dos comportamentos motivados*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 19 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP

*Dedico aos meus pais e avós por sempre
estarem ao meu lado e por acreditarem em mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar o meu caminho.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Newton Sabino Canteras pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por desenvolver esta dissertação. Agradeço pelo apoio, companheirismo e por todas as nossas discussões científicas durante estes anos, estas foram essenciais para o meu amadurecimento e crescimento profissional.

Agradeço à minha Co-orientadora, Prof^a Dra. Sandra Regina Mota Ortiz por ter me ingressado na carreira científica, e por sempre acreditar em mim. Obrigado por você ser minha professora, co-orientadora e amiga durante toda esta caminhada. Sou grato também por você ter sido fundamental em meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço a minha mãe Elaine e ao meu pai Jose, por todo ensinamento e educação que venho adquirindo nesta jornada. Nada disso seria possível sem vocês.

Agradeço aos meus avós Aparecida e Jose, por sempre me incentivarem e acreditarem em mim. Devo tudo a vocês.

Agradeço a minha namorada Laís, por todo apoio nos momentos de dificuldades. Obrigado por você ser a minha melhor amiga e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus colegas de laboratório, Amanda, Kélvia, Miguel Rangel, Miguel Xavier e Simone, por toda ajuda e companheirismo nestes anos.

Aos meus companheiros do Laboratório de Bases Neurais do Comportamento da Universidade Cidade de São Paulo (UNICID), Brunella, Geielle, Midiã, Raquel e Wagner por todo o carinho e amizade construída no decorrer destes anos.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas pela eficiência e suporte.

À FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho (nº processo: 2014/02540-5).

“Resplandecente é a sabedoria, e sua beleza é inalterável: os que a amam descobrem-na facilmente, os que a procuram encontram-na.”

Sabedoria 6, 12-13.

RESUMO

RUFINO, R. A. **Investigação da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na organização das respostas de defesa frente o predador.** 2015. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Neste estudo investigamos o papel da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na expressão das respostas de defesa frente ao predador. Estudos anteriores de nosso laboratório mostram que durante a exposição predatória os animais aumentam a expressão de Fos nos setores dorsais da PAG rostral e no setor ventrolateral da PAG caudal. Assim, através de lesões citotóxicas com NMDA, investigamos o papel destes sítios da PAG nas respostas de defesa frente ao predador. Lesões do setor dorsal da PAG rostral ou do setor ventrolateral da PAG caudal abolem a resposta de congelamento motor e aumentam as respostas de avaliação durante a interação predatória. Em contraste, lesões combinadas destes dois setores da PAG praticamente abolem todas as respostas de defesa, congelamento motor e avaliação de risco. Em nossos experimentos também analisamos a expressão da proteína Fos em estruturas prosencefálicas que medeiam as respostas de defesa frente ao predador. Notamos particularmente nos animais com lesão combinada da PAG uma diminuição significativa da ativação da parte posterior do núcleo hipotalâmico anterior (AHNp; que é um alvo importante da PAG) e do septo lateral (que é densamente aferentado pelo AHNp). Interessantemente, outros sítios prosencefálicos mobilizados durante a exposição ao predador não alteram o seu grau de mobilização nos animais com lesão da PAG. Frente a estes dados, concluímos que tanto a parte dorsal rostral como a parte ventrolateral caudal da PAG são críticas para a expressão das respostas de congelamento motor. Por outro lado, as respostas de avaliação de risco são apenas moduladas pela PAG. Assim, na lesão combinada da PAG, a falta ativação da via PAG-AHNp-Septo Lateral seria suficiente para abolir as respostas de avaliação de risco. Estudos futuros com inativação do Septo Lateral são necessários para comprovar o seu envolvimento no controle dos comportamentos de avaliação de risco.

Palavras-chave: Substância cinzenta periaquedutal. Comportamento de defesa. Avaliação de risco. Septo lateral. Núcleo hipotalâmico anterior.

ABSTRACT

RUFINO, R. A. **Investigation of periaqueductal gray (PAG) in the organization of the defense responses front predator.** 2015. 47 p. Masters thesis (MSc) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

In the present study, we examined the putative roles of the periaqueductal gray (PAG) in the expression of defensive responses in animals exposed to a natural predator. Previous studies have shown that predator exposure induces increased Fos expression in the dorsal part of the rostral PAG and in the ventrolateral part of the caudal PAG. According to the present findings, citotoxic NMDA lesions either in the dorsal part of the rostral PAG or in the ventrolateral part of the caudal PAG abolished freezing responses and increased risk assessment behaviors during predator exposure. In contrast, lesions combining the dorsal part of the rostral PAG and the ventrolateral part of the caudal PAG abolished both freezing and risk assessment responses. We have further investigated Fos expression in prosencephalic sites mobilized during the predator exposure, and particularly in the animals with combined lesions in both the dorsal part of the rostral PAG and the ventrolateral part of the caudal PAG, we found a significant decrease in Fos expression in the posterior part of the anterior hypothalamic nucleus (AHNp; an important target of the PAG) and in the lateral septum (which receives a dense projection from the AHNp). Importantly, the PAG lesions did not affect the mobilization of other prosencephalic sites responsive to predators. Overall, our results suggest that both the dorsal part of the rostral PAG and the ventrolateral part of the caudal PAG are critical for the expression of freezing responses. On the other hand, risk assessment behavior seems to be modulated by the PAG through a circuit involving the AHNp and the lateral septum. At this point, further studies are obviously needed to investigate whether the lateral septum is a critical site for expression of risk assessment responses.

Keywords: Periaqueductal gray. Defensive behavior. Risk assessment. Septum lateral. Anterior hypothalamic nucleus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Circuito responsivo a ameaça predatória	16
Figura 2: Desenho de câmera lucida evidenciando o parcelamento dos níveis e colunas da substância cinzenta periaquedutal em toda a sua extensão rostro (nível 1, 2 e 3) caudal (nível 4, 5 e 6), ilustrando o padrão de distribuição das células imunorreativas a proteína Fos de um rato durante o confronto predatório.....	19
Figura 3: Aparato experimental.	22
Figura 4: Fotomicrografias de cortes transversais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ilustrando o padrão de ativação da PAG ao nível do núcleo de Darkschewitsch (nível 1-A) e ao nível do núcleo oculomotor (nível 2-B e nível 3-C), dos animais controles durante a exposição predatória.	28
Figura 5: Fotomicrografias de cortes transversais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ilustrando o padrão de ativação do setor ventrolateral da PAG caudal (A) e CUN (B) dos animais controles durante a exposição predatória.	29
Figura 6: Fotomicrografias de cortes transversais de encéfalo de rato ilustrando em A, B e C a detecção imunoistoquímica da proteína Fos durante a exposição predatória, e em D, E e F a coloração pelo método de NISSL. Ambas as fotomicrografias ilustram a PAG ao nível do núcleo de Darkschewitsch (nível 1-A e D) e ao nível do núcleo oculomotor (nível 2-B e E; nível 3-C e F), dos animais lesionados (lesão do setor dorsal da PAG rostral).	30
Figura 7: Fotomicrografias de cortes transversais de encéfalo de rato ilustrando em A (setor ventrolateral da PAG caudal) e B (CUN) a detecção imunoistoquímica da proteína Fos durante a exposição predatória, e em C (CUN) e D (setor ventrolateral da PAG caudal) a coloração pelo método de NISSL dos animais lesionados.	31
Figura 8: Fotomicrografias de cortes transversais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ilustrando o padrão de ativação do LSr.dl e do LSr.vl, dos animais controles (A), lesão do setor dorsal da PAG rostral (B), lesão do setor ventrolateral da PAG caudal (C) e lesão combinada (D) durante a exposição predatória.	36
Figura 9: Fotomicrografias de cortes transversais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ilustrando o padrão de ativação do AHNp próximo ao terceiro ventrículo, dos animais controles (A), lesão da parte dorsal da PAG rostral (B), lesão do setor ventrolateral da PAG caudal (C) e lesão combinada (D) durante a exposição predatória.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise comportamental dos grupos experimentais durante o confronto predatório.	34
Tabela 2: Quantificação de células imunorreativas a proteína Fos dos principais sítios prosencefálicos mobilizados durante a exposição ao predador.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

III: Núcleo oculomotor

AQ: Aqueduto mesencéfalo

AHNc: Parte central do núcleo hipotalâmico anterior

AHNp: Parte posterior do núcleo hipotalâmico anterior

Amv: Parte ventral do núcleo anteromedial do tálamo

BMAp: Região posterior do núcleo basomedial da amígdala

BST: Núcleo intersticial da estria terminal

CUN: Núcleo cuneiforme

DMH: Núcleo dorsomedial do hipotálamo

DR: Núcleo dorsal da raphé

HIPv: Hipocampo ventral

LA: Núcleo lateral da amígdala

LHASfa: Parte subfornicial da área hipotalâmica lateral

LS.r.dl: Septo lateral rostral dorsolateral

LS.r.vl: Septo lateral rostral ventrolateral

MEApv: Parte posteroventral do núcleo medial da amígdala

ND: Núcleo de Darkschewitsch

PAG: Substância cinzenta periaquedutal

PAGdm: Coluna dorsomedial da substância cinzenta periaquedutal

PAGdl: Coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal

PAGvl: Coluna ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal

PAGl: Coluna lateral da substância cinzenta periaquedutal

PMd: Núcleo pré-mamilar dorsal

PMDvl: Parte ventrolateral do núcleo pré-mamilar dorsal

PVH: Núcleo paraventricular do hipotálamo

VMHdm: Parte dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo

V3h: Parte hipotalâmica do terceiro ventrículo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 <i>Objetivo geral</i>	20
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 <i>Lesão citotóxica por NMDA.....</i>	21
3.2 <i>Aparato experimental</i>	22
3.3 <i>Habituação</i>	22
3.4 <i>Teste Comportamental.....</i>	22
3.4.1 <i>Parâmetros Comportamentais.....</i>	23
3.5 <i>Perfusão e histologia.....</i>	23
3.6 <i>Detecção Imunoistoquímica da Proteína Fos.....</i>	24
3.7 <i>Quantificação das Células Imunorreativas a proteína Fos.....</i>	25
3.8 <i>Análise Estatística</i>	26
4 RESULTADOS.....	27
4.1 <i>Lesões citotóxicas por NMDA</i>	27
4.2 <i>Análise comportamental.....</i>	32
4.3 <i>Quantificação de células imunorreativas a proteína Fos.....</i>	34
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

O termo medo provém do latim *metus* e pode ser definido como uma perturbação angustiosa perante um risco ou uma ameaça real ou imaginária. Segundo Gross e Canteras (2012) o medo é uma emoção que se caracteriza por intensas alterações comportamentais e fisiológicas provocadas pela percepção de um perigo, seja ele presente ou futuro, real ou suposto, presente tanto nos seres humanos como nos animais.

O comportamento de defesa pode ocorrer em resposta ao ataque de um predador ou também, em resposta a um perigo eminente do próprio ambiente. Esse conjunto de respostas comportamentais é altamente conservado por todos os mamíferos ao longo da evolução e rapidamente condicionado ao estímulo ameaçador ou a situações associadas a ele.

A resposta de defesa natural (incondicionada) de um animal frente ao seu predador é expressa de forma semelhante em todas as espécies de mamíferos e o fato de ser incondicionada implica que a mesma pode ser eliciada em animais selvagens ou de laboratório sem experiência prévia.

Diversos estudos dos pesquisadores Robert Blanchard e Caroline Blanchard da Universidade do Havaí descreveram em detalhes os padrões defensivos dos ratos selvagens e de laboratório em resposta ao predador natural, no caso o gato e a pista olfativa do mesmo (odor de gato), fornecendo uma análise detalhada dos comportamentos de defesa inato e das situações em que eles ocorrem (BLANCHARD; BLANCHARD, 1972; BLANCHARD et al., 1981; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; BLANCHARD; BLANCHARD; ROGERS, 1990). A resposta de defesa incondicionada dos roedores consiste das seguintes reações: escape, congelamento motor (*freezing*), ataque defensivo e avaliação de risco (BLANCHARD et al., 2001). Dentre os comportamentos defensivos, o mais evidente durante o confronto com o gato é o congelamento motor e isto depende da proximidade ao predador, onde este quando apresentado muito próximo ao animal é notado respostas de sobressalto (RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005). Por outro lado, a exposição a apenas a um estímulo ambíguo ao predador tal como o seu odor, promovem respostas de avaliação de risco. Este comportamento inclui orientação e busca de informações sobre estímulos

potencialmente perigosos, seguidos por aproximações da área ou do possível estímulo ameaçador. Estas respostas de avaliação de risco são divididas basicamente em três parâmetros comportamentais: *crouch sniff* (animal permanece imóvel e fareja o ambiente), *stretch attend* (animal permanece imóvel e estende o seu corpo para frente para farejar o ambiente) e *stretch approach* (animal se locomove com o seu corpo para frente e fareja o ambiente).

Como observado na figura 1, diversas são as estruturas que exercem um papel importante na organização das respostas defensivas. Inicialmente, pistas olfatórias providas do bulbo olfatório acessório (MC GREGOR et al., 2004) são integradas na parte posteroventral do núcleo medial da amígdala (MEApv), enquanto os estímulos sensoriais visuais e auditivos são processados pelo núcleo lateral da amígdala (LA) seguido pela parte posterior do núcleo basomedial da amígdala (BMAp) (MARTINEZ et al., 2011). Ambas as pistas sensoriais processadas na amígdala são projetadas para o circuito hipotalâmico de defesa (CANTERAS, 2002), especificamente para o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMHdm). Através das eferências do VMHdm (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1994) outros dois núcleos são mobilizados, tais como o núcleo hipotalâmico anterior (AHN) e a parte ventrolateral do núcleo pré-mamilar dorsal (PMDvl). O PMDvl por sua vez amplifica as respostas defensivas (CEZARIO et al., 2008) através de suas projeções descendentes para a PAG (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1992), onde este seria o sítio neural crítico para a expressão das respostas defensivas. Juntos, este sistema é conhecido como o “circuito responsivo a ameaça predatória” (GROSS; CANTERAS, 2012; CANTERAS; GRAEFF, 2014).

Figura 1: Circuito responsivo a ameaça predatória (CANTERAS; GRAEFF, 2014). Abreviações: LA: núcleo lateral da amígdala; BMAp: parte posterior do núcleo basomedial da amígdala; MEApv: parte posteroventral do núcleo medial da amígdala; VMHdm: parte dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo; AHN: núcleo hipotalâmico anterior; PMDvl: parte ventrolateral do núcleo pré-mamilar dorsal; PAG: substância cinzenta periaquedutal.

A PAG é um sítio neural crítico, tanto para a organização, quanto para a expressão de diversos comportamentos motivados necessários para a manutenção da espécie, tais como o alimentar (VAN ERP et al., 1993; WEISS; LEIBOWITZ, 1985), o maternal (LONSTEIN; STERN, 1997) e o sexual (SAKUMA; PAFF, 1979). E muitos são os trabalhos que demonstram o papel clássico da PAG, originariamente descrito por Hunsperger (1956), como um sítio neural crítico para a expressão das respostas de defesa (BANDLER; SHIPLEY, 1994; CARRIVE, 1993; FANSELOW, 1991), possivelmente através de suas projeções descendentes para o tronco cerebral e medula espinal.

Neuroanatomicamente, a PAG pode ser dividida em 6 diferentes níveis (figura 2), no sentido rostro-caudal: nível do núcleo de Darkschewitsch (nível 1), níveis do núcleo oculomotor (níveis 2 e 3), e os níveis do núcleo dorsal da rafe (níveis 4, 5 e 6, respectivamente) (BANDLER; CARRIVE; ZHANG, 1991; CARRIVE et al., 1997; COMOLI et al., 2003). Analisando o padrão de expressão de Fos ao longo da extensão rostral-caudal da PAG em animais expostos ao predador, foi observado um alto padrão de ativação tanto da parte dorsal rostral (nível 1, 2 e 3 da PAGdm e PAGdl) quanto da parte ventrolateral caudal da PAG (nível 5 e 6) e do núcleo cuneiforme (CUN) (CANTERAS; GOTO, 1999; COMOLI; RIBEIRO-BARBOSA; CANTERAS, 2003).

Um estudo clássico de De Oca e colaboradores (1998) mostra que lesões eletrolíticas da parte dorsal da PAG rostral aumentam as respostas de *freezing* (congelamento motor) durante a ameaça predatória, enquanto lesões do setor ventrolateral da PAG caudal diminuem esta resposta. Entretanto, dados de Sukikara e colaboradores (2010) mostram que lesões da parte dorsal da PAG rostral abolem as respostas defensivas, tais como o *freezing* e as respostas de avaliação de risco durante a exposição ao odor de gato. Corroborando estes resultados (SUKIKARA et al., 2010), dados recentes de nosso grupo (RUFINO; MOTA-ORTIZ; CANTERAS, observação pessoal) mostram que animais portadores de lesões citotóxicas tanto da parte dorsal rostral (nível 2) quanto do setor ventrolateral caudal da PAG (nível 5), abolem também as respostas de *freezing* entretanto aumentam as repostas de avaliação de risco durante a exposição ao predador.

Frente a estes dados é sugestivo relatar que as respostas de *freezing* parecem depender não só da parte ventrolateral caudal, mas também da parte

dorsal rostral da PAG, diferentemente do sugerido por De Oca e colaboradores (1998). Notamos ainda que lesões da parte dorsal rostral ou da parte ventrolateral caudal da PAG aumentam as respostas de avaliação de risco durante o confronto predatório. Diferentemente do observado durante a exposição a um predador, em situações de maior ambiguidade, como por exemplo durante a exposição ao odor do predador, a lesão da PAG dorsal foi capaz de inibir as respostas de avaliação de risco. Em conjunto, estes achados sugerem que a PAG não é uma estrutura crítica para a expressão do comportamento de avaliação de risco, mas teria um papel modulatório na expressão desta resposta.

Tanto a PAG dorsal como a ventrolateral apresentam projeções ascendentes para o circuito hipotalâmico de defesa, especificamente para o AHN (CAMERON et al., 1995), onde através destas vias poderiam potencialmente estar modulando as respostas de avaliação de risco. Sendo assim, neste estudo nós investigamos se lesões citotóxicas do setor dorsal da PAG rostral (nível 1, 2 e 3 da PAGdl e PAGdm) e/ou da parte ventrolateral da PAG caudal (nível 5 e 6), poderiam influenciar as respostas defensivas (*freezing* e avaliação de risco), bem como o padrão de ativação de sítios prosencefálicos durante o confronto predatório.

Figura 2: Desenho de câmera lucida evidenciando o parcelamento dos níveis e colunas da substância cinzenta periaquedutal em toda a sua extensão rostro (nível 1, 2 e 3) caudal (nível 4, 5 e 6), ilustrando o padrão de distribuição das células imunorreativas a proteína Fos de um rato durante o confronto predatório (COMOLI et al., 2003). Abreviações: PAGdm: coluna dorsomedial da PAG; PAGdl: coluna dorsolateral da PAG; PAGl: coluna lateral da PAG; PAGvl: coluna ventrolateral da PAG; DR: núcleo dorsal da raphé; CUN: núcleo cuneiforme; III: núcleo oculomotor; IV: núcleo troclear.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Investigação da parte dorsal da PAG rostral (nível 1, 2 e 3 da PAGdm e PAGdl; figura 2) e da parte ventrolateral da PAG caudal (PAGvl nível 5 e 6; figura 2), na organização das respostas defensivas durante o confronto predatório.

2.2 *Objetivos específicos*

- a) Lesões bilaterais extensas por NMDA da parte dorsal da PAG rostral (níveis 1, 2 e 3 da PAGdm e PAGdl) e investigação das respostas defensivas, bem como da expressão da proteína Fos em sítios prosencefálicos durante o confronto ao predatório.
- b) Lesões bilaterais extensas por NMDA da parte ventrolateral da PAG caudal (nível 5 e 6) e investigação das respostas defensivas, bem como da expressão da proteína Fos em sítios prosencefálicos durante o confronto predatório.
- c) Lesões bilaterais extensas por NMDA combinadas dos setores dorsal da PAG rostral e da parte ventrolateral da PAG caudal e investigação das respostas defensivas, bem como a expressão da proteína Fos em sítios neurais prosencefálicos durante o confronto predatório.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para estes estudos foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*), machos, adultos, com aproximadamente 90 dias de idade (n=21). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (30 x 40 x 18 cm), em salas com sistema de ventilação (23 ± 2 °C) e ciclo de luz de 12 h (1:00 - 13:00). Água e comida foram oferecidas *ad libitum* durante todos os procedimentos experimentais. Todos os protocolos foram aprovados pela “Comissão de Ética em Experimentação Animal” do ICB-USP (decl. 085/ 12/ CEUA)

Neste estudo avaliamos os efeitos comportamentais de animais portadores de lesão citotóxica bilateral por NMDA da parte dorsal da PAG rostral (n=6), da parte ventrolateral da PAG caudal (n=5) e lesão combinada (parte dorsal rostral e ventrolateral caudal da PAG; n=5) durante a exposição ao predador. Além dos grupos de animais lesionados, obtivemos um grupo experimental controle intacto (n=5), que não passou por qualquer cirurgia estereotóxica. Em todos os grupos experimentais, além da análise comportamental, realizamos a quantificação de células imunorreativas a proteína Fos dos principais sítios neurais prosencefálicos particularmente mobilizados durante o confronto predatório.

3.1 Lesão citotóxica por NMDA

Através de cirurgias estereotóxicas realizamos lesões citotóxicas bilaterais por NMDA (N-Methyl-D-Aspartic Acid, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) na PAG dorsal rostral compreendendo os setores dorsomedial e dorsolateral (níveis 1 a 3; figura 2; ântero-posterior: -5,8 mm em relação ao bregma; médio-lateral: 0,5 mm em relação ao seio sagital superior para os lados esquerdo e direito; dorso-ventral: -4,3 mm em relação superfície cerebral) e/ou na PAG caudal compreendendo o setor ventrolateral especificamente os níveis 5 e 6 (ver Figura 2) se estendendo lateralmente ao núcleo cuneiforme (CUN; ântero-posterior: -7,7 mm em relação ao bregma; médio-lateral: 0,7 mm em relação ao seio sagital superior para os lados esquerdo e direito; dorso-ventral: -4,8 mm em relação superfície cerebral). Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma solução de cloridrato de pentobarbital sódico (Cristália, Itapira, SP, Brasil; 40 mg/ kg i.p.) e em seguida

posicionados no aparelho estereotáxico, onde receberam depósito de uma solução de NMDA a 0,15 M bilateralmente em cada um dos sítios neurais descritos anteriormente. Os depósitos foram feitos através de uma microseringa (Hamilton, Reno, Nevada, USA) mediante aplicação de 200 nl (50 nl p/ min).

3.2 Aparato experimental

O aparato experimental em acrílico é constituído de uma caixa moradia (25 x 25 x 25 cm), ligada a um corredor que dá acesso a caixa 2 (figura 3).

Figura 3: Aparato experimental. Caixa 1: “Home Cage”; Corredor: “Hallway”; Caixa 2: “Food Compartment”.

3.3 Habituação

Uma semana após a recuperação cirúrgica, os animais foram isolados na caixa moradia do aparato experimental e passaram por um período de habituação de 10 dias. Durante esses 10 dias, 3 horas antes do período de escuro os animais foram privados da ração. Na primeira hora do período de escuro, onde ocorre um surto de atividade exploratória pela busca do alimento, a porta da caixa moradia é aberta permitindo que os animais explorem o corredor e se desloquem até a caixa 2 (“Food Compartment”), para obterem a ração ali depositada. Nos dias 8, 9 e 10 os animais foram habituados na sala onde foi realizado o teste de exposição ao predador.

3.4 Teste Comportamental

No décimo primeiro dia, na primeira hora do período de escuro um gato foi colocado na caixa 2 (“Food Compartment”) imediatamente antes da abertura da

porta da caixa moradia, e as respostas comportamentais foram observadas durante 10 minutos.

Durante os experimentos comportamentais, é importante destacar que não houve contato físico entre os animais e o gato, onde os animais experimentais só tiveram contato visual e olfativo com o predador.

Este período do teste comportamental (10 minutos) foi filmado e as respostas comportamentais e as medidas espaço-temporais foram analisadas utilizando o programa específico para análise comportamental “The Observer” (versão 5.1 - Noldus, sacramento, CA, USA).

3.4.1 Parâmetros Comportamentais

“Freezing”: O animal permanece imóvel, num estado de congelamento motor.

“Crouch sniff”: O animal permanece parado, com dorso arqueado, fazendo movimentos com a cabeça para cheirar e esquadrihar o ambiente (Avaliação de risco).

“Stretch attend”: O animal estende a cabeça e parte do corpo para frente, mantém a cauda elevada e permanece imóvel (Avaliação de risco).

“Stretch approach”: O animal estende a cabeça e parte do corpo para frente, mantém a cauda elevada e desloca-se para frente (Avaliação de risco).

“Stading”: O animal fica em pé, com as patas traseiras e dianteiras estendidas e apoiadas nas paredes do aparato.

“Rearing”: O animal tem seu peso apoiado nas patas traseiras, e as patas dianteiras estão afastadas do chão e mantidas próximas ao corpo. Pode ser acompanhado de olfação e de movimentos pendulares da cabeça.

Exploração: O animal permanece explorando o ambiente e se locomove pelo aparato experimental.

3.5 Perfusão e histologia

Após o teste comportamental, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cloridrato de Ketamina 5% (Konig, São Paulo, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina 2% (Konig, São Paulo, SP, Brasil) a 0,2% na proporção 0,4 ml/100 g de peso corporal. Em seguida, através de uma bomba peristáltica (Cole

Parmer, São Paulo, SP, Brasil) os animais foram perfundidos por via transcardíaca inicialmente com 150 ml de uma solução salina 0,9% seguida de 1000 ml de uma solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M com pH de 7,4. Os encéfalos permaneceram na caixa craniana por 3 horas antes de serem removidos e transferidos para uma solução contendo sacarose 20% em tampão fosfato de potássio 0,02 M, onde permaneceram por aproximadamente 12 horas.

A seguir, cortes frontais seriados com 40 μ m de espessura foram obtidos utilizando-se um micrótomo de congelação (Hyrax S50 Zeiss, USA). Os cortes foram colhidos sequencialmente em 4 (quatro) compartimentos. O primeiro compartimento foi utilizado para detecção imunoistoquímica da proteína Fos, e um segundo foi utilizado para coloração pelo método de Nissl, com tionina 0,25% como corante para servir como referência citoarquitetônica.

3.6 Detecção Imunoistoquímica da Proteína Fos

Na reação imunoistoquímica para detecção da proteína Fos, os cortes foram incubados inicialmente em uma solução de tampão fosfato de potássio 0,02 M contendo triton X-100 a 0,3%, soro normal de cabra a 2% (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e anticorpo primário anti-Fos obtido em coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) numa diluição de 1:20.000, sob agitação constante, a 4 °C, durante 72 horas. Para localização do complexo antígeno-anticorpo os cortes foram incubados por 90 minutos no anticorpo secundário biotilado feito em cabra (Biotinylated anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na diluição 1:200. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado usando-se a técnica de imunoperoxidase com o complexo biotina-avidina (ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para ligar a peroxidase ao complexo antígeno-anticorpo. Após lavagens sucessivas, os cortes foram incubados em uma solução contendo 50 mg de tetrahidrocloreto de 3-3'diaminobenzidina (DAB), 0,6 mg de glicose oxidase, 40 mg de cloreto de amônio e 2 ml de solução aquosa de sulfato de níquel a 10% em 100 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M, por 5 minutos. Em seguida, foi adicionada a β -D-glicose (Sigma Saint Louis, Missouri, USA), e a reação enzimática interrompida após um período de tempo variável, em geral em torno de 8 minutos.

Por fim, os cortes foram montados em lâminas recobertas com gelatina, desidratados e recobertos com DPX (Aldrich Chemical, Oxford, Mississippi, USA)

3.7 Quantificação das Células Imunorreativas a proteína Fos

Inicialmente, foi feita a seleção de imagens correspondente as regiões mais mobilizadas (Fos positivas) durante a exposição ao predador, a saber: estruturas do septo (septo lateral rostral dorsolateral - LSr.dl; septo lateral rostral ventrolateral - LSr.vl), tálamo (parte ventral do núcleo anteromedial do tálamo - Amv) e hipotálamo (núcleo paraventricular do hipotálamo - PVH; parte central do núcleo hipotalâmico anterior - AHNc; parte posterior do núcleo hipotalâmico anterior - AHNp; área hipotalâmica lateral subfornicial - LHAsfa; parte dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo - VMHdm; núcleo dorsomedial do hipotálamo - DMH; parte posteroventral do núcleo medial da amígdala - MEApv; núcleo pré-mamilar dorsal - PMd (SWANSON, 2004 para parcelamento das áreas). Quantificamos as células Fos positivas utilizando um microscópio Nikon 80i (Nikon Corporation, Chiyoda-Ku, Tokyo-To, Japan) equipado com uma câmera digital Nikon DXM1200F (Nikon Corporation, Chiyoda-Ku, Tokyo-To, Japan) em um aumento de 10 x. Para a quantificação das células Fos positivas, fizemos o delineamento das bordas das regiões de interesse, definidas com o auxílio da série corada pelo método de Nissl. As células Fos positivas foram contadas dentro das bordas da região de interesse, sendo consideradas apenas aquelas com núcleos ovais e bem coradas. A densidade de células Fos positivas foi determinada pelo número de células imunorreativas a proteína Fos, dividido pela área da região de interesse. Vale ressaltar que as contagens foram feitas bilateralmente em cada sítio neural analisado, onde o valor da densidade fornecida nos resultados é uma média destas duas contagens.

A contagem do número total de células e a determinação da área foram feitas com o auxílio do programa computacional Image-Pro Plus (Image-Pro Plus, versão 4.5.1, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

3.8 Análise Estatística

Após o teste de homogeneidade de variância (*Levine's test*), tanto os dados comportamentais quanto os de densidade de células imunorreativas a proteína Fos foram analisados utilizando uma análise multivariada de variância (MANOVA). Obtendo as respectivas significâncias, submetemos os dados a uma ANOVA univariada para cada variável dependente. Devido ao grande número de variáveis dependentes, o nível de significância utilizado na ANOVA univariada foi ajustado para baixo (correção de Bonferroni, dados comportamentais: $\alpha=0,0055$; densidade de células imunorreativas a proteína Fos: $\alpha=0,0045$). Para as variáveis dependentes que atingiram diferenças significativas entre os grupos, foi feito um pós-teste (*Tukey's HSD test*), para isolarmos os respectivos efeitos entre os diversos grupos ($p<0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Lesões citotóxicas por NMDA

Como ilustrado nas figuras 4 e 5, os animais do grupo controle apresentaram uma clara expressão da proteína Fos no setor dorsal da PAG rostral (nível 1, 2 e 3; figura 4A, B e C) no setor ventrolateral da PAG caudal (nível 5; figura 5A) e CUN (figura 5B)

No sítio de lesão com NMDA observamos nos cortes corados pelo método de Nissl acentuada perda neuronal acompanhada de intensa gliose e uma diminuição acentuada da marcação imunoistoquímica da proteína Fos, como é notável nas lesões na parte dorsal da PAG rostral (figura 6). Devido á lesão da parte ventrolateral da PAG caudal ser muito extensa, inevitavelmente acometemos também o CUN (Figura 7). Em 6 animais as lesões estavam centradas na parte dorsal da PAG rostral, 5 animais apresentavam lesões na parte ventrolateral da PAG caudal e CUN adjacente, e em 5 animais obtivemos lesões combinadas da parte dorsal da PAG rostral e da parte ventrolateral da PAG caudal e CUN.

Figura 4: Fotomicrografias de cortes transversais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ilustrando o padrão de ativação da PAG ao nível do núcleo de Darkschewitsch (nível 1-A) e ao nível do núcleo oculomotor (nível 2-B e nível 3-C), dos animais controles durante a exposição predatória. Abreviações: AQ: aqueduto mesencefálico; PAGdl: coluna dorsolateral da PAG; PAGdm: coluna dorsomedial da PAG; ND: núcleo de Darkschewitsch; III: núcleo oculomotor.

Figura 5: Fotomicrografias de cortes transversais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ilustrando o padrão de ativação do setor ventrolateral da PAG caudal (A) e CUN (B) dos animais controles durante a exposição predatória. Abreviações: PAGdm: coluna dorsomedial da PAG; PAGl: coluna lateral da PAG; PAGvl: coluna ventrolateral da PAG; DR: núcleo dorsal da raphé; AQ: aqueduto mesencefálico.

Figura 6: Fotomicrografias de cortes transversais de encéfalo de rato ilustrando em A, B e C a detecção imunoistoquímica da proteína Fos durante a exposição predatória, e em D, E e F a coloração pelo método de NISSL. Ambas as fotomicrografias ilustram a PAG ao nível do núcleo de Darkschewitsch (nível 1-A e D) e ao nível do núcleo oculomotor (nível 2-B e E; nível 3-C e F), dos animais lesionados (lesão do setor dorsal da PAG rostral). Abreviações: AQ: aqueduto mesencefálico; PAGdl: coluna dorsolateral da PAG; PAGdm: coluna dorsomedial da PAG; ND: núcleo de Darkschewitsch; III: núcleo oculomotor.

Figura 7: Fotomicrografias de cortes transversais de encéfalo de rato ilustrando em A (setor ventrolateral da PAG caudal) e B (CUN) a detecção imunoistoquímica da proteína Fos durante a exposição predatória, e em C (CUN) e D (setor ventrolateral da PAG caudal) a coloração pelo método de NISSL dos animais lesionados. Abreviações: PAGdm: coluna dorsomedial da PAG; PAGdl: coluna lateral da PAG; PAGvl: coluna ventrolateral da PAG; DR: núcleo dorsal da raphé; AQ: aqueduto mesencefálico; CUN: núcleo cuneiforme.

4.2 Análise comportamental

Como ilustramos na tabela 1, durante a exposição ao predador, os animais controles ficavam a maior parte do teste experimental na caixa 1, e permaneciam a maior parte do tempo congelados (*freezing*). Ocasionalmente podiam apresentar também comportamentos de avaliação de risco, principalmente “*crouch sniff*”, e em muito menor grau “*stretch postures*” (*stretch attend* e *approach*).

Através da análise multivariada de variância (MANOVA) foi observado uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($Wilks\ lambda=0,00006$; $F(27, 26,927)=26,876$; $p<0,001$).

Como descrito na tabela 1, a ANOVA univariada mostrou um efeito de grupo para as variáveis espaço temporais *caixa 1* ($F=8,1472$; $p=0,0014$) e *corredor* ($F=8,1401$; $p=0,0014$).

Em relação aos comportamentos, foi observado um efeito de grupo (ANOVA univariada) para as variáveis comportamentais *crouch sniff* ($F=117,9648$; $p<0,001$), *freezing* ($F=579,1504$; $p<0,001$), *stretch approach* ($F=12,2261$; $p<0,001$) e *exploração* ($F=121,8874$; $p<0,001$).

Semelhantemente aos animais do grupo controle, os animais com lesão no setor dorsal da PAG rostral e os com lesão do setor ventrolateral da PAG caudal ficavam a maior parte do tempo na *caixa 1* (lesão dorsal da PAG rostral x grupo controle, $p=0,9934$; lesão ventrolateral da PAG caudal x grupo controle, $p=0,9624$; *Tukey's HSD test*). Em relação aos parâmetros comportamentais, os animais com lesão no setor dorsal da PAG rostral e os com lesão o setor ventrolateral da PAG caudal apresentaram comportamentos semelhantes entre si, porem, totalmente diferentes das respostas observadas nos animais controles. Tanto o grupo com lesão no setor dorsal da PAG rostral como o com lesão do setor ventrolateral da PAG caudal apresentaram uma inibição completa das respostas de *freezing*, estatisticamente diferente do observado nos animais controles (lesão dorsal PAG rostral x grupo controle, $p<0,001$; lesão ventrolateral da PAG caudal x grupo controle, $p<0,001$; *Tukey's HSD test*), além de aumentarem significativamente as respostas de *crouch sniff*, quando comparado ao grupo controle (lesão dorsal da PAG rostral x controle, $p<0,001$; lesão ventrolateral da PAG caudal x controle, $p<0,001$; *Tukey's HSD test*). Os demais parâmetros de avaliação de risco não

diferiram dos animais controles (*stretch approach*: lesão dorsal da PAG rostral x grupo controle, $p=0,9094$; lesão ventrolateral da PAG caudal x grupo controle, $p=0,9888$; e *stretch attend*: lesão dorsal da PAG rostral x grupo controle, $p=0,9999$; lesão ventrolateral da PAG caudal x grupo controle, $p=0,9149$; *Tukey's HSD test*). As repostas de *standing* (lesão dorsal da PAG rostral x controle, $p=0,9993$; lesão ventrolateral da PAG caudal x controle, $p=0,9999$; *Tukey's HSD test*), *rearing* (lesão dorsal da PAG rostral x controle, $p=0,4685$; lesão ventrolateral da PAG caudal x controle, $p=0,8648$; *Tukey's HSD test*) e exploração (lesão dorsal da PAG rostral x controle, $p=0,2294$; lesão ventrolateral da PAG caudal x controle, $p=0,3740$; *Tukey's HSD test*) também não diferiram do grupo controle.

Os animais do grupo lesão combinada do setor dorsal da PAG rostral e setor ventrolateral da PAG caudal diminuem o tempo de permanência na *caixa 1* e aumentam o tempo no *corredor*, apresentando uma diferença estatisticamente significativa em ambos os compartimentos quando comparado com os animais controles (corredor: $p=0,0046$; caixa 1: $p=0,0046$; *Tukey's HSD test*), lesão dorsal da PAG rostral (corredor: $p=0,0019$; caixa 1: $p=0,0019$; *Tukey's HSD test*) e lesão ventrolateral da PAG caudal (corredor: $p=0,0124$; caixa 1: $p=0,0124$; *Tukey's HSD test*).

Interessantemente, os animais do grupo lesão combinada além de perderem as respostas de *freezing* quando comparado aos animais controles ($p<0,001$; *Tukey's HSD test*), diminuem drasticamente as respostas de *crouch sniff* em comparação com os grupos de lesão isoladas dos setores dorsal rostral e ventrolateral caudal da PAG (lesão dorsal da PAG rostral, $p<0,001$; lesão ventrolateral da PAG caudal, $p<0,001$; *Tukey's HSD test*). Desta forma, o principal comportamento observado nestes animais foram as respostas *exploratórias*, onde é notável um aumento significativo deste comportamento quando comparado aos grupos controle ($p<0,001$; *Tukey's HSD test*), lesão dorsal da PAG rostral ($p<0,001$; *Tukey's HSD test*) e lesão ventrolateral da PAG caudal ($p<0,001$; *Tukey's HSD test*). Em relação as respostas de *stretch*, apenas o *stretch approach* apresentou um aumento significativo em relação aos grupos controle ($p<0,001$; *Tukey's HSD test*), lesão dorsal da PAG rostral ($p<0,001$; *Tukey's HSD test*) e lesão ventrolateral da PAG caudal ($p<0,001$; *Tukey's HSD test*), diferentemente do observado no *stretch attend* que não apresentou diferenças estatísticas significativas

entre os grupos experimentais (controle, $p=1$; lesão dorsal da PAG rostral, $p=0,9999$; lesão ventrolateral da PAG caudal, $p=0,9149$; *Tukey's HSD test*).

Tabela 1: Análise comportamental dos grupos experimentais durante o confronto predatório.

Exposição ao Predador

	Controle (n=5)	Lesão dorsal da PAG rostral (n=6)	Lesão ventrolateral da PAG caudal (n=5)	Lesão combinada (n=5)	F(3,17); p
<u>Compartimentos</u>					
Caixa 1	565 ± 25,36	578 ± 2,55	539,60 ± 32,01	354,4 ± 64,58	8,14; 0,0014*
Corredor	35,20 ± 25,29	22,17 ± 2,62	60,40 ± 32,01	245,6 ± 64,58	8,14; 0,0014*
Caixa 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	-
<u>Comportamentos</u>					
Crouch sniff	97,40 ± 21,97	487,5 ± 26,87	496,60 ± 10,36	94 ± 17,31	117,96; <0,001*
Freezing	442,40 ± 19,10	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	579,15; <0,001*
Exploração	39 ± 18,58	85,67 ± 20,79	79,60 ± 9,46	445,8 ± 13,74	121,88; <0,001*
Stretch approach	3,60 ± 1,20	5,83 ± 2,04	3,60 ± 1,20	37,8 ± 9,75	12,22; <0,001*
Stretch attend	2,68 ± 2,58	2,66 ± 0,98	3,0 ± 1,58	2,6 ± 1,16	0,22; 0,8802
Rearing	0 ± 0	1,83 ± 1,32	0,83 ± 0,40	2 ± 0,83	1,03; 0,4008
Standing	17,60 ± 8,17	16,67 ± 4,9	18,0 ± 4,84	16 ± 0,94	0,02; 0,9935

Valores expressos em média ± erro padrão dos parâmetros comportamentais observados nos grupos experimentais durante o confronto predatório. Análise univariada de variância (ANOVA) seguida de uma correção de Bonferroni * $p<0,0055$.

4.3 Quantificação de células imunorreativas a proteína Fos

Além da análise comportamental, realizamos a quantificação de células imunorreativas a proteína Fos dos principais sítios prosencefálicos mobilizados durante o confronto predatório.

A MANOVA revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (*Wilks lambda*=0,00013; $F(39, 15,554)=7,8394$; $p<0,001$).

Como descrito na tabela 2, a ANOVA univariada mostrou um efeito de grupo apenas para as variáveis LSr.vl ($F=6,3974$; $p=0,0042$) e AHNp ($F=12,0632$; $p<0,001$).

Em relação a densidade de células imunorreativas a proteína Fos do LSr.vl, o pós teste (*Tukey's HSD test*) revelou que os animais com lesão combinada (figura 8D) apresentaram uma mobilização significativamente menor quando comparado

aos animais controle (figura 8A; $p=0,0095$), lesão dorsal da PAG rostral (figura 8B; $p=0,0095$) e lesão ventrolateral da PAG caudal (figura 8C; $p=0,0138$).

Por outro lado, a densidade de células Fos positivas na AHNp do grupo lesão combinada (figura 9D) apresentou uma redução significativa quando comparado com os grupos controle (figura 9A; $p<0,001$) e lesão ventrolateral da PAG caudal (figura 9C; $p=0,0167$). Notadamente, a densidade de células Fos positivas do AHNp dos animais lesão dorsal da PAG rostral (figura 9B) também apresentou uma redução significativa quando comparado ao grupo controle (figura 9A; $p=0,0044$).

Tabela 2: Quantificação de células imunorreativas a proteína Fos dos principais sítios prosencefálicos mobilizados durante a exposição ao predador.

Densidade de células Fos+ por mm²

Núcleos	Controle (n=5)	Lesão dorsal da PAG rostral (n=6)	Lesão ventrolateral da PAG caudal (n=5)	Lesão combinada (n=5)	F(3,17); p
LSr.dl	1353 ± 316,3	891,3 ± 110,9	920,3 ± 29,46	441,7 ± 42,27	4,86; 0,0127
LSr.vl	1293 ± 197,4	1264 ± 123,5	1260 ± 82,48	615,3 ± 65,38	6,39; 0,0042*
AMv	1115 ± 109,3	1069 ± 77,27	1041 ± 84,36	1527 ± 174,7	3,84; 0,0287
PVH	913 ± 279,5	481,2 ± 159,5	1219 ± 233,5	1646 ± 265,9	4,63; 0,0152
AHNc	930,1 ± 48,82	832,7 ± 47,08	945,3 ± 28,19	724,5 ± 38,40	5,57; 0,0075
AHNp	1166 ± 111,6	727,7 ± 85,81	891,7 ± 51,59	507,9 ± 32,16	12,06; <0,001*
LHAsfa	652,6 ± 95,12	585,8 ± 60,54	689,7 ± 85,39	709,1 ± 95,11	0,45; 0,7185
VHMdm	1300 ± 106,6	1225 ± 72,63	1493 ± 27,26	1445 ± 85,48	2,62; 0,0838
DMH	891,3 ± 63,62	891,9 ± 53,85	959,2 ± 55,61	871,2 ± 81,45	0,34; 0,7909
MEApv	546,1 ± 123	654,4 ± 56,39	773,8 ± 43,68	427,3 ± 52,75	3,82; 0,0290
PMd	1666 ± 71,19	1660 ± 84,62	1909 ± 66,34	1679 ± 179,7	0,20; 0,3375

Valores expressos em média ± erro padrão da densidade de células imunorreativas a proteína Fos por mm² dos sítios neurais durante o confronto predatório. Análise univariada de variância (ANOVA) seguida de uma correção de Bonferroni * $p<0,0045$.

Figura 8: Fotomicrografias de cortes transversais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ilustrando o padrão de ativação do LSr.dl e do LSr.vl, dos animais controles (A), lesão do setor dorsal da PAG rostral (B), lesão do setor ventrolateral da PAG caudal (C) e lesão combinada (D) durante a exposição predatória. Abreviações: LSr.dl: parte dorsolateral do septo lateral rostral; LSr.vl: parte ventrolateral do septo lateral rostral VL: ventrículo lateral; aco: comissura anterior.

Figura 9: Fotomicrografias de cortes transversais de encéfalo de rato imunorreagidos para proteína Fos, ilustrando o padrão de ativação do AHNp próximo ao terceiro ventrículo, dos animais controles (A), lesão da parte dorsal da PAG rostral (B), lesão do setor ventrolateral da PAG caudal (C) e lesão combinada (D) durante a exposição predatória. Abreviações: PVH: núcleo paraventrículo do hipotálamo; AHN: núcleo hipotalâmico anterior; fx: fórnice; V3h: parte hipotalâmica do terceiro ventrículo; VMHdm: parte dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo; VMHc: parte central do núcleo ventromedial do hipotálamo.

5 DISCUSSÃO

Observando os dados obtidos é possível notar que a lesão isolada do setor dorsal rostral ou da parte ventrolateral caudal da PAG inibem a expressão do congelamento motor e aumentam as respostas de avaliação de risco. Além disso, notamos uma diminuição de células Fos positivas no AHNp dos animais lesão do setor dorsal da PAG rostral. Por outro lado, quando efetuado uma lesão combinada destas regiões é notado uma diminuição significativa das respostas de avaliação de risco, acompanhado de uma menor mobilização no AHNp e LSr.vl.

De Oca e colaboradores (1998) demonstram que lesões da parte dorsal da PAG rostral aumentam as respostas de *freezing*. Destacamos inicialmente que no paradigma experimental destes autores, durante a exposição ao gato, os animais permaneciam apenas 20% do tempo em congelamento motor, em contraste a 80% a 90% do tempo observado em nossos experimentos (CEZÁRIO et al., 2008; MARTINEZ et al., 2011; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005; ver Tabela 1). Segundo estes autores, animais com lesão da PAG dorsal dobram o tempo de congelamento motor. No momento não temos uma explicação para esta discrepância entre nossos achados e os de De Oca e colaboradores (1998), uma possibilidade seria que estes autores estejam quantificando o comportamento de “*crouch sniff*” como sendo o congelamento motor.

Diversos são os trabalhos que apontam o setor ventrolateral da PAG caudal como sendo um sítio neural crítico para expressão do congelamento motor (BEATRICE et al., 1998). Estimulações químicas (MORGAN; CARRIVE, 2001) ou elétricas (FANSELOW, 1991) deste setor particular geram comportamentos de *freezing*, enquanto lesões causam redução deste comportamento (BEATRICE et al., 1998; JOHANSEN et al., 2010; KIM; RISON; FANSELOW, 1993), evidenciando assim um papel crítico deste setor na organização desta resposta.

Provavelmente o *freezing* dependa de uma organização motora envolvendo a medula espinal. Projeções descendentes da parte ventrolateral da PAG caudal para este setor parecem ser necessárias para a expressão do *freezing* (KEAY; BANDLER, 2001). Trabalhos recentes mostram que a ativação da parte ventrolateral da PAG caudal durante o condicionamento de medo reduz a transmissão das vias espinho-olivo-cerebelar durante os períodos de congelamento, e este sistema está

associado com um aumento do tônus muscular por estimular motoneurônios α presentes na medula espinal (KOUTSIKOU et al., 2014; KOUTSIKOU et al., 2015).

As lesões do setor ventrolateral da PAG caudal também acomete adjacientemente o CUN. Apesar deste sítio neural se apresentar altamente mobilizado durante o confronto predatório (CANTERAS; GOTO, 1999; ver figura 5B), não existem trabalhos na literatura a respeito do papel deste núcleo nas respostas defensivas.

O setor dorsal da PAG rostral também modula as respostas de congelamento motor, uma vez que a lesão deste sítio neural aboliu este determinado comportamento durante a exposição do predador. Ainda não sabemos como a PAG dorsal possa modular as respostas de *freezing*, mas uma possibilidade seria através de suas densas projeções para a parte ventrolateral da PAG (CAMERON et al., 1995; MOTA-ORTIZ, observação pessoal). Assim, concluímos que a expressão do congelamento motor durante a exposição ao predador depende da integridade tanto da parte dorsal rostral quanto do setor ventrolateral caudal da PAG.

Observamos também que as lesões isoladas do setor dorsal rostral e da parte ventrolateral caudal da PAG aumentam as respostas de avaliação de risco durante o confronto predatório, sugerindo que a integridade destes sítios neurais não são críticos para a expressão deste comportamento. Interessantemente, em situações com maior grau de ambiguidade, como durante a exposição ao odor de gato, a lesão da porção dorsal da PAG rostral abole as respostas de avaliação de risco (SUKIKARA et al., 2010). Em conjunto, estes dados indicam que a PAG poderia modular as respostas de avaliação de risco, e dependendo do grau de ambiguidade da situação aversiva, os efeitos da lesão destes sítios neurais podem ser mais ou menos evidentes na expressão da avaliação de risco.

A porção dorsal da PAG rostral apresenta densas projeções para o AHNp (CAMERON et al., 1995), e em nossos experimentos foi observado uma diminuição de células imunorreativas a proteína Fos do AHNp nos animais lesão da parte dorsal da PAG rostral. Desta forma é sugestivo que a parte dorsal da PAG rostral module o padrão de ativação do AHNp através de suas projeções ascendentes, entretanto a lesão restrita deste setor da PAG não aboliu as respostas de avaliação de risco.

Da mesma forma que o setor dorsal rostral, a parte ventrolateral da PAG caudal também envia eferências para o AHNp (CAMERON et al., 1995), e desta forma também poderia modular as respostas de avaliação de risco.

Todavia, a lesão combinada do setor dorsal rostral e ventrolateral caudal da PAG praticamente aboliu as respostas defensivas, pois além de inibir as respostas de *freezing*, diminui significativamente as respostas de avaliação de risco e aumentou os comportamentos exploratórios. Além disso, notamos uma clara diminuição de células Fos positivas no AHNp e no LSr.vl destes animais. Vale Ressaltarmos, que o AHNp se projeta densamente para o LSr.vl (RISOLD; CANTERAS; SWANSON, 1994). Portanto, nossa hipótese é que provavelmente as respostas de avaliação de risco estejam sendo moduladas através de um circuito envolvendo a comunicação entre a porção dorsal rostral e o setor ventrolateral caudal da PAG com o AHNp e este por fim com o LSr.vl (figura 11). Sendo assim, é necessário efetuarmos experimentos com inativações farmacológicas do LS durante a exposição ao predador para evidenciarmos o possível papel crítico deste sítio neural na expressão das respostas de avaliação de risco.

Figura 11: Possível circuito neural envolvido na organização das respostas das respostas de avaliação de risco durante a ameaça predatória. Abreviações: PAGdm: coluna dorsomedial da PAG; PAGdl: coluna dorsolateral da PAG; PAGl: coluna lateral da PAG; PAGvl: coluna ventrolateral da PAG; DR: núcleo dorsal da raphé; III: núcleo oculomotor; LSR.vl: parte ventrolateral do septo lateral rostral; LA: núcleo lateral da amígdala; BMAp: parte posterior do núcleo basomedial da amígdala; parte posteroventral do núcleo medial da amígdala; VMHdm: parte dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo; AHN: núcleo hipotalâmico anterior; PMDvl: parte ventrolateral do núcleo pré-mamilar dorsal.

Evidências suportam a ideia do LS estar envolvido com a organização das respostas de avaliação de risco. A aplicação de um antagonista de receptor GABAA (picrotoxina) no LS aumenta a expressão das respostas de avaliação de risco, além de gerar um aumento do ritmo teta hipocampal (FARÍAS et al., observação pessoal). Frente a estes dados, é lícito sugerirmos que este comportamento possivelmente esteja sendo moduladas através de um circuito envolvendo a PAG-AHNp-LS, que potencialmente pode influenciar a formação hipocampal.

O hipocampo apresenta um papel importante na modulação de estados afetivos/emocionais, tais como a ansiedade (GRAY; MCNAUGHTON, 1996). Esta estrutura parece ter um papel central na detecção de conflitos, gerando respostas que variam entre aproximação e esquiva do estímulo aversivo. A ocorrência destas respostas levaria ao quadro de ansiedade. Esta situação de conflito onde possivelmente ocasionaria a ansiedade, se adéqua perfeitamente a situações onde o animal realiza respostas de avaliação de risco. Um estudo de Pentkowski e

colaboradores (2006) mostra que lesões do hipocampo ventral (HIPv) interfere nas respostas de avaliação de risco de animais expostos ao ambiente previamente associado ao predador.

Frente a todos estes dados, é sugestivo relatar que a parte dorsal rostral e a parte ventrolateral caudal da PAG são críticas para a expressão das respostas de congelamento motor. Entretanto, as respostas de avaliação de risco são apenas moduladas pela PAG. Interessantemente, o fato da lesão deste sítio neural abolir ou não a avaliação de risco estaria relacionado com o grau de ambiguidade do estímulo aversivo. Por exemplo, quando o animal se depara apenas com o odor do predador, por se tratar de um estímulo mais fraco a lesão apenas da parte dorsal da PAG rostral (SUKIKARA et al., 2010) já seria suficiente para diminuir a ativação da via AHNp-LS, ocasionando na inibição das respostas de avaliação de risco. Por outro lado, quando o estímulo é mais aversivo, como no caso da presença de um predador, a lesão restrita do setor dorsal rostral ou ventrolateral caudal da PAG, não seria suficiente para diminuir a ativação da via AHNp-LS, e assim as respostas de avaliação seriam expressas. Entretanto, quando efetuado uma lesão combinada do setor dorsal rostral e ventrolateral caudal da PAG, a ativação da via PAG-AHN-LS seria inibida, ocasionando perda das respostas de avaliação de risco.

6 CONCLUSÃO

Frente aos dados obtidos é possível sugerir que tanto a parte dorsal rostral quanto o setor ventrolateral caudal da PAG exerceria um papel crítico na expressão das respostas de *freezing*. Por outro lado, as respostas de avaliação de risco parecem ser moduladas pela PAG, possivelmente através de uma via que envolve o AHN e o LSr.vl. O grau de ativação do LSr.vl parece estar correlacionado com a ocorrência ou não das respostas de avaliação de risco.

REFERÊNCIAS*

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZHANG, S. P. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. **Prog. Brain Res.**, v. 87, p. 269-305, 1991.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends Neurosci.**, v. 17, p. 379-389, 1994.

BEATRICE, M. DE OCA.; JOSEPH, P. DECOLA.; STEPHEN, M.; MICHAEL, S. F. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. **J. Neurosci.**, v. 18, n. 9, p. 3426-3432, 1998.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 81, p. 281-290, 1972.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J.; LEE, M. C.; WILLIAMS, G. Taming in the wild Norway rats following lesions in the basal ganglia. **Physiol. Behav.**, v. 27, n. 6, p. 995-1000, 1981.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu. Rev. Psychol.**, v. 39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Anti-predator defensive behaviors in a visible burrow system. **J. Comp. Psychol.**, v. 103, n. 1, p. 70-82, 1989.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J.; ROGERS, R. J. Pharmacological and neural control of anti-predator defense in rat. **Aggres. Behav.**, v. 6, p. 165-175, 1990.

BLANCHARD, R. J.; YANG, M.; LI, C.; GERVACIO, A.; BLANCHARD, D. C. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 25, n. 7-8, p. 587-595, 2001.

CAMERON, A. A.; KHAN, I. A.; WESTLUND, K. N.; WILLIS, W. D. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. II. Descending projections. **J. Comp. Neurol.**, v. 351, n. 4, p. 585-601, 1995.

CANTERAS N. S.; SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Projections of the ventral premammillary nucleus. **J. Comp. Neurol.**, v. 324, n. 2, p. 212-195, 1992

CANTERAS, N. S.; SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 348, n. 1, p. 41-79, 1994.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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. **Brain. Res. Bull.**, v. 43, n. 3, p. 297-305, 1997.

CANTERAS, N. S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. **NeuroReport**, v. 10, n. 2, p. 413-418, 1999.

CANTERAS, N.S. The Medial Hypothalamic defensive system: Hodological Organization and Functional Implications. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 71, n. 3, p. 481-491, 2002.

CANTERAS, N. S.; GRAEFF, F. G. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: implications for panic disorder. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 3, p. 352-364, 2014.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neural organization. **Behav. Brain. Res.**, v. 58, p. 27-47, 1993.

CARRIVE, P.; LEUNG, P.; HARRIS, J.; PAXINOS, G. Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. **Neuroscience**, v. 78, n. 1, p. 165-177, 1997.

CEZARIO, A. F.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; BALDO, M. V. C.; CANTERAS, N. S. Hypothalamic sites responding to predator threats – the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. **Eur. J. Neurosci.**, v. 28, p. 1003-1015, 2008.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behav. Brain. Res.**, v. 138, n. 1, p. 17-28, 2003.

DE OCA, B.M.; DE COLA, J.P.; MAREN S.; FANSELOW M.S. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. **J. Neurosci.**, v. 18, n. 9, p. 3426-3432, 1998.

FANSELOW, M. S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A.; BLANDER, R. **The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization**. Plenum Press, 1991. p. 151-173.

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. The neuropsychology of anxiety: reprise. **Nebr. Symp. Motiv.**, v. 43, p. 61-134, 1996.

GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 13, n. 9, p. 651-658, 2012.

HUNSPERGER, R. W. Affective reaction from electric stimulation of brain stem in cats. **Helv. Physiol. Pharmacol. Acta**, v. 14, p. 70-92, 1956.

JOHANSEN, J. P.; TARPLEY, J. W.; LEDOUX, J. E.; BLAIR, H. T. Neutral substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdale and periaqueductal gray. **Nat. Neurosci.**, v. 13, n. 8, p. 979-986, 2010.

KEAY, K. A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 25, n. 7-8, p. 669-678, 2001.

KIM, J. J.; RISON, R. A.; FANSELOW, M. S. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. **Behav. Neurosci.**, v. 107, n. 6, p. 1093-1098, 1993.

KOUTSIKOU, S.; CROOK, J. J.; EARL, E. V.; LEITH, J. L.; WATSON, T. C.; LUMB, B. M.; APPS, R. Neural substrates underlying fear-evoked freezing: the periaqueductal grey–cerebellar link. **J. Physiol.**, v. 592, n. 10, 2014.

KOUTSIKOU, S.; WATSON, T. C.; CROOK, J. J.; LEITH, J. L.; LAWRENSON, C. L.; APPS, R.; LUMB, B. M. **J. Neurosci.**, v. 35, n. 42, p. 14132-14147, 2015.

LONSTEIN, J.; STERN, J. M. Role of the midbrain periaqueductal gray in maternal nurturance and aggression: c-Fos and electrolytic lesion studies in lactating rats. **J. Neurosci.**, v. 17, n. 9, p. 3364-3378, 1997.

MARTINEZ, R. C.; CARVALHO-NETO, E. F.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; BALDO, M. V.; CANTERAS, N. S. Amygdalar roles during exposure to a live predator and to a predator-associated context. **Neuroscience**, v. 172, p. 314-328, 2011.

MCGREGOR, I. S.; HARGREAVES, G. A.; ALPFELBACH, R.; HUNT G. E. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. **J. Neurosci.**, v. 24, n. 17, p. 4134-4144, 2004.

MORGAN, M. M.; CARRIVE, P. Activation of the ventrolateral periaqueductal gray reduces locomotion but not mean arterial pressure in awake, freely moving rats. **Neuroscience**, v. 102, n. 4, p. 905-910, 2001.

NADEL, L.; MACDONALD, L. Hippocampus: cognitive map or working memory? **Behav. Neural. Biol.**, v. 29, n. 3, p. 405-409, 1980.

PENTKOWSKI, N. S.; BLANCHARD, D. C.; LEVER, C.; LITVIN, Y.; BLANCHARD, R. J. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. **Eur. J. Neurosci.**, v. 23, n. 8, p. 2185-2196, 2006.

RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S.; CEZÁRIO, A. F.; BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. An alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 29, n. 8, p. 1255-1263, 2005.

RISOLD, P. Y.; CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the anterior hypothalamic nucleus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 348, n. 1, p. 1-40, 1994.

SAKUMA, Y.; PAFF, D. W. Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 237, p. 278-284, 1979.

SUKIKARA, M. H.; MOTA-ORTIZ, S. R.; BALDO, M. V.; FELICIO, L. F.; CANTERAS, N. S. The periaqueductal gray and its potential role in maternal behavior inhibition in response to predatory threats. **Behav. Brain Res.**, v. 209, n. 2, p. 226-233, 2010.

SWANSON, L. W. **Brain maps: structure of the rat brain**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. 215 p.

VAN ERP, A. M. M.; KRUK, M. R.; MEELIS, W.; VEENING, J. G. Periaqueductal gray lesions do not affect grooming induced electrically in the hypothalamic paraventricular area in the rat. **Behav. Brain Res.**, v. 59, p. 95-101, 1993.

WEISS, G. F.; LEIBOWITZ, S. F. Efferent projections from the paraventricular nucleus mediating alpha2-noradrenergic feeding. **Brain Res.**, v. 347, p. 225-238, 1985.