CLEYTON ROBERTO SOBRINHO

MAPEAMENTO DOS SÍTIOS CATECOLAMINÉRGICOS QUE AFERENTAM O NÚCLEO PRÉ-MAMILAR DORSAL

Dissertação apresentada ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

CLEYTON ROBERTO SOBRINHO

MAPEAMENTO DOS SÍTIOS CATECOLAMINÉRGICOS QUE AFERENTAM O NÚCLEO PRÉ-MAMILAR DORSAL

Dissertação apresentada ao Departamento de Anatomia 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

São Paulo
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.

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

© reprodução total

Sobrinho, Cleyton Roberto.
Mapeamento dos sítios catecolaminérgicos que aferentam o núcleo pré-mamilar dorsal / Cleyton Roberto Sobrinho. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Newton Sabino Canteras.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Bases Neurais dos Comportamentos Motivados.

Versão do título para o inglês: Catecholaminergic imputs to the dorsal premammillary nucleus.

Descritores: 1. Comportamento 2. Noradrenalina 3. Hipotálamo 4. Medo 5.Ansiedade 6. Catecolaminas I. Canteras, Newton Sabino II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0215/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cleyton Roberto Sobrinho.

Título da Dissertação: Mapeamento dos sítios catecolaminérgicos que aferentam o núcleo pré-mamilar dorsal.

Orientador(a): Newton Sabino Canteras.

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

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

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição.....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.053.08

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 130/05/CEEA, datado de 29.11.05 e por solicitação do Prof. Dr. Newton Sabino Canteras, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno CLEYTON ROBERTO SOBRINHO 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 referido certificado.

São Paulo, 08 de outubro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEEA- ICB/USP

EXPEDIÇÃO
DATA 13/10/08
REL. N.º 4278

Em memória de

Naima, João, Lalá, Adriana e Dinho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Newton Sabino Canteras, por sua orientação, por me guiar e tolerar minha ansiedade durante todo esse tempo. Pelo espaço concedido para realização deste trabalho e por ter me oferecido apoio que vai muito além de suas obrigações. Por ti, tenho muita admiração e serei sempre grato.

Aos professores Jackson Cioni Bittecourt, Vagner Antunes e Marucia Chacur que estiveram presente durante o exame de qualificação e contribuíram imensamente para a finalização deste trabalho.

Aos professores presentes na banca examinadora de defesa, pela avaliação, leitura e atenção dispensada.

Aos funcionários dos mais diversificados setores do ICB, sempre solícitos e de crucial importância para o andamento e finalização do projeto.

Aos membros do Laboratório de Neuroanatomia Funcional: Adriana, Amanda, Cibele, Claúdia, Eduardo, Flávia, Isadora, Márcia, Miguel, Raquel, Sandra, Simone e Wagner pelas horas de convivência, pelos conhecimentos transferidos, pelas discussões (científicas ou não), horas de descontração e também pela paciência.

Aos professores Luciane Sita, Sara J. Shammah Lagnado, Martin A. Metzger sempre solícitos quando requisitados.

Aos professores Jackson, Marucia, Newton, Renato e Silvia pela oportunidade de participar do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, assim como ao professor Edson pelos conhecimentos anatômicos.

A Professora Maria Inês Nogueira e aos alunos do Laboratório de Neurociências por me abrirem uma janela enquanto muitas portas se fechavam.

A Raquel, Eduardo, Flávia, João, Marcio, Luana, Luciano e aos membros do laboratório de Neuroanatomia da Dor que ajudaram a transformar meus dias em dias melhores. Serão sempre meus amigos.

Aos amigos (alunos, técnicos e professores) espalhados por todos os departamentos do ICB, IB e outras unidades, não só pelos conhecimentos e aconselhamentos, mas também pelos churrascos, cafés e bandejões, em especial à Milena, Pri, Leila, Vanderlei, Wilma, Luciana, Silvia, Marcos, Aline, Julieta, Darine, Fernando, Laila, Daniel, Adilson, Alice, Maria Tereza, Dedé, Rosana e claro, Eduardo Rebelato (você é o SUMA) com quem tive o privilégio de conviver e aprendi a admirar pelo caráter, sinceridade e porque não é sempre que encontro alguém mais teimoso que eu.

Ao meu pai José Miguel Sobrinho, um homem simples, porém de caráter incontestável, pelo seu apoio incondicional, sempre a sua maneira.

A minha irmã Denise e ao meu cunhado José Fernando, por tolerarem minha impaciência e por me darem um motivo pra existir, um motivo pra lutar e pra voltar pra casa, meu sobrinho Estevão.

As famílias Oliveira Baldoino, Rodrigues, Ubiali Jacinto e a todos amigos e familiares pelo apoio, amizade e companheirismo ao longo dos anos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo indispensável auxílio financeiro (processo 2008/55922-1).

Enfim, espero não ter esquecido ninguém. É muito difícil enumerar todas as pessoas que contribuem para uma etapa como essa, porque a meu ver transcendem a execução de um trabalho por se tratar da formação de um indivíduo. Nem mesmo acredito que seja possível quantificar ou adotar valores para as diversas formas de apoio que recebemos, sendo muitas vezes necessário apenas alguém que nos ouça. Mas sobre tudo gostaria de agradecer um grande amigo, pela irmandade que vem perdurando ao longo dos anos, onde já pudemos compartilhar as mais variadas emoções. Monstro (Rodrigo), 11 anos não são 11 dias, não é mesmo? A você meu grande amigo, meu irmão, serei eternamente grato. Meu muito obrigado.

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma pessoa substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."

(Charles Chaplin 1889-1977)

RESUMO

SOBRINHO, C. R. **Mapeamento dos sítios catecolaminérgicos que aferentam o núcleo pré-mamilar dorsal.** 2010. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Nos últimos anos, uma série de estudos têm mostrado a importância do núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) na expressão do comportamento de defesa exibido por roedores durante o confronto direto com um predador natural ou com o seu odor, assim como em situações de ameaça predatória contextual. Cabe ressaltar que este núcleo representa o sítio hipotalâmico que apresenta o aumento mais expressivo de células imunorreativas a proteína Fos observadas após o confronto predatório direto ou contextual. Sabe-se que o PMd possui um plexo de fibras noradrenérgicas e suplementando este dado, estudos recentes mostram que a mediação noradrenérgica central é crítica para a expressão das respostas de medo inato e contextual às meaças predatórias. Os resultados deste estudo mostraram que tanto as respostas incondicionadas como as contextuais ao odor do gato dependem de uma ação noradrenérgica central, mediada pelo núcleo pré-mamilar dorsal. Neste sentido, dada a importância da modulação noradrenérgica no PMd para a expressão das respostas anti-predatórias incondicionadas e contextuais, investigamos no presente projeto quais grupamentos catecolaminérgicos aferentam o núcleo. Para tanto, empregamos técnicas de rastreamento retrógrado somado a técnica de imunofluorescência (dupla-marcação). Nossos resultados revelaram que a única fonte de aferência catecolaminérgica para o PMd é oriunda do *locus ceruleus*, onde encontramos um número conspícuo de células duplamente marcadas, indicando ser este o responsável pelo suporte noradrenérgico ao PMd. Além disso, nossos dados são particularmente interessantes, dado o papel bem definido do LC em processos atencionais.

Palavras-Chave: Comportamento de defesa. *Locus Ceruleus.* Medo. Ansiedade. Hipotálamo.

ABSCTRACT

SOBRINHO, C. R. **Catecholaminergic imputs to the dorsal premammillary nucleus.** 2010. 47 p. Master thesis (Morphofunctional Sciences) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A great deal of evidence suggests the medial hypothalamic defensive system, centered around the anterior hypothalamic nucleus, dorsomedial part of the ventromedial hypothalamic nucleus, and the dorsal premammillary nucleus (PMd) plays a pivotal role in processing inputs from amygdalar circuits integrating predator-derived cues, and from the septo-hippocampal system relaying contextual processing from a predator-related environment. The PMd occupies a strategic position in the medial hypothalamic defensive system, and is one of the most responsive hypothalamic sites during exposure to a predator or its odor, and to a context previously associated with a predatory threat. Data from literature have shown that fear responses to predatory threats rely heavily on the PMd beta adrenergic neurotransmission. Thus, it has been shown that propranolol, injected systemically, significantly reduced PMd–Fos expression in response to cat odor, and that beta adrenoceptor blockade, in the PMd, reduced defensive responses to both cat odor exposure and cat odor-related context. Given the importance of the noradrenergic innervation of the PMd to the expression of unconditioned and learned fear responses, we have presently investigated the putative noradrenergic source of inputs to the nucleus. To this end, we have combined Fluoro-Gold retrograde tract-tracing and catecholamine immunostaining, and found that the *locus ceruleus* is seemingly the only source of catecholaminergic source of inputs to the PMd. In addition, the present findings are particularly interesting given the well-documented roles of the *locus ceruleus* roles in attentional processes.

Key words: Defensive behavior. *Locus coeruleus. Fear. Anxiety. Hypothalamus.*

LISTA DE ABREVIATURAS

3V - Terceiro ventrículo

A1-A7 - grupamentos noradrenérgicos

A8-A9 - grupamentos dopaminérgicos

ABC - Complexo Avidina Biotina

AHN - núcleo hipotalâmico anterior

AMv - núcleo ântero-medial do tálamo, parte ventral

B - núcleo de Barrington

BMAp - núcleo basomedial da amígdala, parte posterior

C1-C3 - grupamentos adrenérgicos

CA1/Subiculum - campo hipocampal CA1 e subicular

CEA - núcleo central da amígdala

DAB - tetrahidrocloreto de 3-3'diaminobenzidina

DTN - núcleo tegmental dorsal

FG - Fluoro-Gold

Fx - fórnice

LA - núcleo lateral da amígdala

LC - *locus ceruleus*

LDT - núcleo tegmental laterodorsal

LHAsf - área hipotalâmica lateral, parte subfornicial

LS - núcleo septal lateral

MEA - núcleo medial da amígdala

MEApv – núcleo medial da amígdala, parte póstero-ventral

mtt - trato mamilo-talâmico

NI - núcleo incerto

PAG – matéria cinzenta periaquedutal

PMd – núcleo pré-mamilar dorsal

SG - núcleo supragenual

TH - Tirosina Hidroxilase

VMHdm - núcleo ventromedial do hipotálamo, parte dorsomedial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagramas esquemáticos dos sistemas neurais envolvidos no processamento das ameaças predatórias incondicionadas e condicionadas contextuais.....19

Figura 2. Fotomicrografia em campo claro de um corte frontal ao nível do PMd, corado pelo método de Níssl e em campo escuro imunorreagido para a detecção de Tirsosina Hidroxilase.....32

Figura 3. Fotomicrografia em campo claro de corte frontal ilustrando o local de injeção do traçador r em um corte frontal imunorreagido para a detecção de Fluoro Gold ilustrando células retrogradamente marcadas localizadas no território do *locus ceruleus*.....33

Figura 4. Fotomicrografia utilizando epifluorescência de corte frontal ilustrando o local de injeção do traçador (centro de injeção e alo). Corte não reagido, visualizado através da fluorescência do traçador.....33

Figura 5. Desenhos feitos em câmera lúcida ilustrando a distribuição das células retrogradamente marcadas ao longo de toda a extensão do *locus ceruleus*.....34

Figura 6. Fotomicrografia utilizando epifluorescência de corte frontal ao nível do LC ilustrando células imunopositivas para tirosina hidroxilase e fluoro-gold indicando o posicionamento das células duplamente marcadas.....35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO *14*

1.1 Comportamentos motivados *15*

1.2 O circuito hipotalâmico de defesa *15*

1.2.1 O papel funcional do PMd e seus principais alvos de projeção *18*

1.3 A modulação noradrenérgica das respostas anti-predatórias e os grupamentos noradrenérgicos *19*

2 OBJETIVO *22*

3 MATERIAL E MÉTODOS *24*

3.1 Animais *25*

3.2 Injeções iontoforética do traçador retrógrado (Fluoro-Gold) *25*

3.3 Perfusão e histologia *25*

3.4 Detecções imunohistoquímica do FG para revelação do local de injeção e mapeamento geral das células retrogradamente marcadas nos grupamentos catecolaminérgicos *26*

3.5 Análise imunohistoquímica da distribuição das fibras catecolaminérgicas no PMd *27*

3.6 Reação de dupla imuno-fluorescência para fluoro-gold (FG) e tirosina hidroxilase (TH) *27*

3.7 Análise do material *28*

3.7.1 Microscopia de campo claro: desenhos em câmera lúcida *28*

3.7.2 Microscopia de epifluorescência *28*

3.7.3 Fotomicrografias *28*

4 RESULTADOS *29*

4.1 Identificação da inervação TH positiva no PMd *30*

4.2 Identificação das aferências TH positivas para o PMd *30*

5 DISCUSSÃO *36*

6 CONCLUSÃO *40*

REFERÊNCIAS* *42*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Comportamentos motivados

Os comportamentos motivados são aqueles fundamentais para a sobrevivência do indivíduo ou da espécie e, portanto, acompanhados de alto grau motivacional, tais como os comportamentos alimentar, reprodutor e defensivo. O hipotálamo, sabidamente responsável pela integração de diversas respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais, fundamentais para a sobrevivência do indivíduo e da espécie, desempenha um papel chave para a organização destes comportamentos (SWANSON, 2000).

Localizado entre a hipófise e o tálamo, o hipotálamo ocupa a parte ventral do diencéfalo de cada lado do terceiro ventrículo e é composto por três distritos longitudinais (zonas periventricular, medial e lateral). A zona periventricular contém a maioria dos neurônios motores neuroendócrinos e também está diretamente envolvida no controle do sistema autonômico (SWANSON, 2000). Do ponto de vista comportamental, a zona periventricular exerce um papel crítico na expressão de comportamentos ligados à manutenção do meio interno, como os comportamentos de ingestão alimentar e hídrica.

A zona medial consiste de uma série de grupos celulares muito bem visualizados a partir de colorações por métodos de Níssl. É fundamental para a organização de diversas respostas motivadas, tais como comportamentos reprodutivos e defensivos. Uma análise sistemática das projeções dos núcleos da zona medial rostrais ao corpo mamilar revelou dois circuitos parcialmente segregados (SIMERLY e SWANSON, 1988; CANTERAS e SWANSON, 1992; CANTERAS et al., 1992, 1994; RISOLD et al., 1994). Um circuito composto pelo núcleo hipotalâmico anterior, parte dorsomedial do núcleo ventromedial e núcleo pré-mamilar dorsal, e o outro pelos núcleos pré-óptico medial, parte ventrolateral do núcleo ventromedial e núcleo pré-mamilar ventral. Do ponto de vista funcional, o primeiro circuito está envolvido na organização de respostas de defesa à predadores naturais e portanto, foi denominado de circuito hipotalâmico de defesa (CANTERAS, 2001), enquanto o segundo circuito é sexualmente dimórfico e parece estar envolvido na mediação de comportamentos reprodutivos e agonistícos sociais (SWANSON, 2000).

1.2 O Circuito hipotalâmico de defesa

Para delinear os circuitos hipotalâmicos potencialmente envolvidos na integração das respostas de defesa em situações naturais, foi avaliada a imunorreatividade à proteína Fos no

hipotálamo de ratos após o confronto com um gato, seu predador natural (CANTERAS et al., 1997). O confronto direto com o predador é acompanhado de episódios de congelamento motor com tentativas de fuga (BLANCHARD et al., 1989) e induz aumento na expressão da proteína Fos em sítios hipotalâmicos específicos. No hipotálamo medial, o aumento da expressão da proteína Fos é particularmente evidente no circuito formado pelo núcleo hipotalâmico anterior (AHN), a parte dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo (VMHdm) e núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) sendo que este último apresenta aumento mais expressivo de células Fos imunorreativas (CANTERAS et al., 1997). Posteriormente, estudos mostraram que lesões químicas relativamente circunscritas a este último sítio neural, o PMd, reduzem drasticamente as respostas de fuga e congelamento motor durante o confronto com o predador (CANTERAS et al., 1997). Estes resultados foram posteriormente confirmados e ampliados por Blanchard et al. (2003) que mostraram que a lesão do PMd reduz drasticamente tanto as respostas de esquiva e congelamento ao odor do gato, quanto a resposta de congelamento e fuga quando o gato está presente. Estes dados mostram que o PMd possui um papel crítico nas respostas de defesa expressas durante o confronto direto com predadores naturais ou ao seu odor. Contudo, as lesões no PMd não foram capazes de aumentar a atividade exploratória dos braços abertos no labirinto em cruz elevado (resposta incondicionada), nem diminuir o *freezing* condicionado ao choque nas patas desses animais (BLANCHARD et al., 2003).

Esses resultados indicam que diferentes vias podem estar envolvidas na organização das respostas comportamentais frente a diferentes tipos de estímulos aversivos, e em particular apontam para a especificidade do circuito hipotalâmico de defesa para as respostas comportamentais a estímulos ligados aos predadores naturais (BLANCHARD et al., 2003).

O circuito hipotalâmico de defesa, ilustrado na figura 1, integra informações do sistema septo-hipocampal e amigdalar. O AHN está envolvido na integração de informações do sistema septo-hipocampal veiculadas pela parte rostral do núcleo septal lateral (RISOLD e SWANSON, 1997). Além disso, sítios hipocampais recebem aferências de distritos amigdalares responsivos a presença do predador, em particular do núcleo lateral e núcleo basomedial da amígdala (PETROVICH et al., 2001).

O VMHdm, por sua vez, integra informações amigdalares oriundas particularmente da parte póstero-ventral do núcleo medial e da parte posterior do núcleo basomedial. Experimentos examinando o padrão de expressão da proteína Fos mostraram que durante a exposição ao gato, sistemas amigdalianos específicos estão envolvidos na detecção da presença do predador. Ratos expostos ao gato apresentam um aumento significativo na

expressão de Fos na porção posteroventral do núcleo medial da amígdala (MEApv), na parte posterior do núcleo basomedial (BMAp) e em regiões caudais do núcleo lateral (LA) (CANTERAS et al., 2001; MARTINEZ et al., 2010). Dielenberg et al. (2001) demonstraram em ratos, que a exposição ao odor do gato leva a uma grande e seletiva ativação do MEApv, sugerindo que esta região particular da "amígdala vomeronasal" está envolvida no processamento do odor do predador.

O núcleo medial da amígdala (MEA) representa o sítio amigdalar com aumento mais expressivo de células imunorreativas à proteína Fos após o confronto direto com o predador natural (MARTINEZ et al., 2010). Corroborando estes resultados, trabalhos com lesões envolvendo o MEA mostraram que animais com lesões centradas neste núcleo praticamente abolem a expressão de comportamentos defensivos (como o congelamento e a esquiva), aumentando sua locomoção e sua atividade exploratória quando expostos ao gato (MARTINEZ et al., 2010) ou ao seu odor. (LI et al., 2004). A integração amigdalar de outras pistas relativas ao predador, que não o seu odor, é aparentemente processada por um circuito envolvendo as porções caudais do LA e o BMAp, que são maciçamente conectados. As regiões caudais do LA, e em menor grau o BMAp, integram informações de áreas corticais associativas visuais e auditivas (MCDONALD, 1998; SHI e CASSEL, 1999) e desta forma, estão em posição de responder a um amplo espectro de informações sensoriais relativas ao predador que não somente o odor. Durante a exposição ao predador ou contexto associado, lesões centradas nestes núcleos resultaram em alterações similares as observadas após lesões no MEA (MARTINEZ et al., 2010). Ainda, estudos anteriores indicam que o complexo amigdalar basolateral pode atuar tanto no processo de aquisição como na consolidação da memória aversiva contextual (ROGAN e LEDOUX, 1996; TAKAHASHI et al., 2007). Especificamente, a lesão ou a inibição farmacológica deste sítio imediatamente após a exposição ao odor do gato levou à redução da resposta defensiva contextual no teste de medo condicionado (TAKAHASHI et al., 2007).

Curiosamente, apesar do núcleo central da amigdala (CEA) ser fundamental para as respostas exibidas no teste de medo condicionado (LEDOUX et al., 1988, 2000), esse se mostrou pouco mobilizado durante a ameaça predatória, e lesões centradas neste núcleo não foram capazes de alterar a resposta comportamental frente ao predador natural, novamente reforçando a hipótese de que circuitos segregados podem responder seletivamente a diferentes ameaças (MARTINEZ et al., 2010).

1.2.1 O papel funcional do PMd e seus principais alvos de projeção

Conforme ilustrado na figura 1, o PMd interfere tanto com as respostas de defesa incondicionadas como contextuais. O papel funcional deste sítio hipotalâmico parece depender de seus principais alvos de projeção, a saber, a parte ventral do núcleo ântero-medial do tálamo, envolvido no processamento mnemônico das respostas aversivas (CARVALHO-NETTO et al., 2010), e alvos específicos da matéria cinzenta periaquedutal, envolvidos na expressão das respostas de defesa inatas e contextuais (CEZÁRIO et al., 2008).

Diversas evidências sugerem que a projeção para a parte ventral do núcleo ântero-medial do tálamo desempenha um importante papel no processo de formação da memória contextual às ameaças predatórias. Estas evidências foram salientadas por Carvalho-Netto et al. (2010) que demonstraram que a lesão unilateral deste sítio talâmico é capaz de reduzir as respostas contextuais, mas não alteram as respostas incondicionadas de animais expostos ao gato. Este efeito é gradativamente potencializado quando a lesão acomete bilateralmente esse núcleo e/ou afeta também o núcleo Reuniens, um outro sítio talâmico que também recebe aferências do PMd (CANTERAS e SWANSON, 1992).

A matéria cinzenta periaquedutal (PAG) está envolvida na execução do comportamento de defesa durante o confronto com o predador ou em resposta ao contexto associado, bem como participa na mediação das respostas autônomicas durante a defesa anti-predatória (LEDOUX et al., 1988; BITTECOURT et al., 2004; CEZARIO et al., 2008). Fernandes de Molina e Husperger (1962) propõem que o circuito envolvido nas respostas de defesa está hierarquicamente organizado, uma vez que lesões centradas na PAG, e não nas demais regiões, foram capazes de abolir por completo as respostas defensivas expressas por gatos não anestesiados após estimulações intracranianas. Corroborando essa proposta, foi demonstrado que estimulações elétricas ou químicas centradas na PAG de ratos foram capazes de evocar o repertório de respostas defensivas (BITTENCOURT et al., 2004). De particular interesse, estudos utilizando o traçador anterógrado Leucoaglutina do Phaseulus Vulgaris revelaram que a coluna dorsolateral da PAG, em menor grau dorsomedial, são inervadas pela porção ventrolateral do PMd (GOTO et al., 2005; MOTTA et al., 2009). Adicionalmente, posterior análise utilizando a proteína Fos como ferramenta neuroanatômica revelou que existe correspondência entre as áreas descritas acima e aquelas que apresentam aumento mais expressivo de células Fos imunorreativas após o confronto com o predador (MOTTA et al., 2009). Pesquisas recentes apontam que o glutamato é um neurotransmissor fundamental na via entre o PMd e a PAG, uma vez que a inibição de receptores de NMDA na

PAG resulta na redução dos comportamentos exibidos em conseqüência da exposição ao predador (AGUIAR et al., 2009).

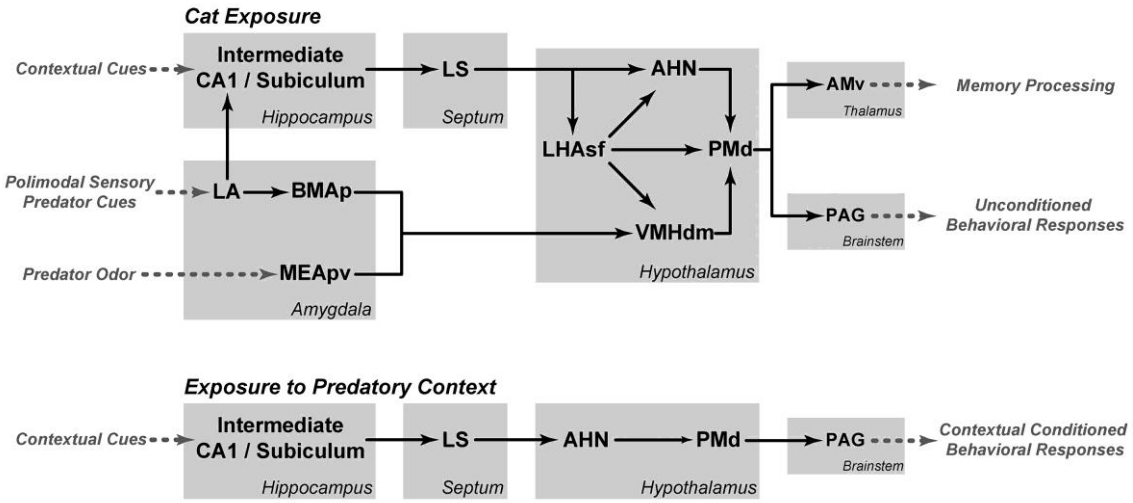

Figura 1. Diagramas esquemáticos mostrando os sistemas neurais envolvidos no processamento das ameaças predatórias incondicionadas e condicionadas contextuais, bem como no processamento das respostas de defesa anti-predatória inatas e condicionadas (ver Cezário et al., 2008). Abreviações: AHN – núcleo hipotalâmico anterior; AMv – núcleo ântero-medial do tálamo, parte ventral; BMAp – núcleo basomedial da amígdala, parte posterior; CA1/Subiculum – campo hipocampal CA1 e subicular; LA – núcleo lateral da amígdala; LHAsf – área hipotalâmica lateral, parte subfornicial; LS – área septal; MEApv – núcleo medial da amígdala, parte póstero-ventral; PAG – matéria cinzenta periaquedutal; PMd – núcleo pré-mamilar dorsal; VMHdm – núcleo ventromedial do hipotálamo, parte dorsomedial.

1.3 A modulação noradrenérgica das respostas anti-predatórias e os grupamentos noradrenérgicos

A transmissão noradrenérgica tem sido implicada em mudanças comportamentais relacionadas ao estresse (BREMNER et al., 1996; MORILAK et al., 2005). Nesse contexto, agentes beta-bloqueadores são amplamente usados em distúrbios ansiogênicos, tais como fobia social (BRUNELLO et al., 2000), distúrbios pós-traumáticos (GILES, 2005; VAIVA et al., 2003), e distúrbios do pânico (HIRSCHMANN et al., 2000). Em modelos animais de ansiedade, o propranolol, um agente beta-bloqueador, é capaz de promover efeitos ansiolíticos em testes comportamentais como o do labirinto em cruz elevado (GORMAN e DUNN, 1993; AUDI et al., 1991) e o do campo aberto (ANGRINI et al., 1998). Do Monte et al. (2008) compararam os efeitos de agentes beta-bloqueadores de ação central (propranolol) aos agentes beta-bloqueadores de ação periférica (nadolol) nas respostas incondicionadas e contextuais ao odor de gato. Os autores também examinaram um possível substrato neural mediando a

modulação noradrenérgica destas respostas de defesa ao odor de gato. Os resultados demonstraram que beta-bloqueadores de ação central (propranolol) administrados sistemicamente reduzem as respostas de defesa incondicionadas e reduzem drasticamente a ativação do PMd em resposta ao odor de gato. As alterações comportamentais observadas após a aplicação sistêmica de beta-bloqueador foram replicadas após a aplicação de outro agente beta-bloquedor, o atenolol, diretamente no PMd. Demonstrando assim, que a aplicação local reduziu as respostas de defesa durante a exposição direta ao odor de gato.

Evidências experimentais indicam a adrenalina é liberada em situações com alto teor emocional, e tem um papel chave na consolidação mnemônica de eventos aversivos (MCGAUGH, 2004). Em concordância com este dado, tanto a aplicação periférica de beta-bloqueador de ação central (propranolol), quanto a aplicação local (atenolol), reduziram as respostas contextuais exibidas quando os animais foram re-expostos ao ambiente no qual haviam sido expostos ao odor de gato no dia anterior (DO MONTE et al., 2008). Além disso, a aplicação de atenolol no PMd imediatamente antes do contexto predatório reduziu as respostas de defesa adquiridas na sessão de condicionamento durante a exposição ao odor de gato no dia anterior. Estes achados sugerem que tanto as respostas incondicionadas, como as contextuais ao odor de gato dependem de uma ação noradrenérgica central mediada pelo núcleo pré-mamilar dorsal (PMd), que representa o sítio neural mais responsivo às ameaças predatórias (CANTERAS et al., 1997; DIELENBERG et al., 2001; STAPLES et al., 2008; MARTINEZ et al., 2008; CEZÁRIO et al., 2008).

As células produtoras de noradrenalina do cérebro estão quase que exclusivamente confinadas no bulbo e na ponte. Com base na topografia, elas podem ser divididas em três sistemas principais formados pelo complexo do *locus ceruleus*, o sistema do tegmento lateral e o grupamento associado ao núcleo do trato solitário (LINDVALL e BJÖRKLUND, 1983).

O *locus ceruleus* (LC), que corresponde ao grupamento **A6**, está localizado no tronco encefálico, na região periventricular cinzenta do istmus. Topograficamente contínuo na porção mais ventral do LC está o núcleo subceruleus, que contém alguns neurônios noradenérgicos e faz parte do complexo do LC. O complexo LC tem ainda uma extensão dorsal na parte lateral do teto do quarto ventrículo, que corresponde ao grupamento **A4** (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964; LINDVALL e BJÖRKLUND, 1983).

As células do sistema do tegmento lateral se estendem do pólo caudal do bulbo até o núcleo motor do trigêmio na ponte e são divididas em uma parte pontina e outra bulbar (na medula oblonga) (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964; PALKOVITS e JACOBOWITZ, 1974; SWANSON, 1975; LINDVALL e BJÖRKLUND, 1983; MOORE e CARD, 1984).

As células da parte bulbar (formada pelos grupamentos **A1** e **A3**) estendem-se da decussação das pirâmides até o terço cranial dos núcleos olivares inferiores. Próximo às pirâmides, o grupamento A1 encontra-se imediatamente lateral ao núcleo reticular lateral. No rato, as células do grupo A3 são difíceis de distinguir do grupo A1 e por isso, frequentemente referidas em conjunto apenas como grupamento A1 (LINDVALL e BJÖRKLUND, 1983). As células da parte pontina (formada pelos grupamentos **A5** e **A7**) são distribuídas do nível da parte rostral do núcleo do nervo facial até o nível do núcleo motor do trigêmio. O grupamento A5 está situado caudalmente, e localiza-se medialmente à saída do nervo facial, próximo ao complexo olivar superior. Rostralmente, a células noradrenérgicas se estendem entre a borda do pedúnculo cerebelar superior e o lemnisco lateral, formando o grupamento A7. (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964).

As células que compõem o grupamento **A2** estão no núcleo do trato solitário, também com algumas células no núcleo motor dorsal do vago (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964).

O LC foi o primeiro sistema neuromodulador a ser delineado anatomicamente (para revisão ver MAEDA, 2000). No rato, compreende aproximadamente 1500 neurônios de cada lado do tronco cerebral que enviam projeções para todo o sistema nervoso central, incluindo medula espinal, tronco cerebral, cerebelo, diencéfalo e córtex, e é visto como o principal grupamento noradrenérgico (SWANSON, 1975; MOORE e CARD, 1984).

Corroborando o papel da neurotransmissão noradrenégica central durante a exposição a ameaças predatórias, estudos prévios demonstraram que o *locus ceruleus* está particularmente mobilizado durante a exposição ao predador ou ao seu odor (DIELENBERG et al., 2001; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005). Sabe-se que o PMd possui um plexo de fibras noradrenérgicas (MOORE e CARD, 1984), contudo ainda não foi determinada a origem desta invervação.

Em síntese, existe uma mediação central da transmissão noradrenérgica na resposta de defesa anti-predatória, influenciando as respostas incondicionadas e condicionadas, como também a aquisição das respostas contextuais de medo. Notavelmente, o PMd parece ser um local crítico para mediar tais efeitos. Todavia, ainda não está determinado quais são os sítio noradrenégicos que aferentam o PMd. Neste sentido, dada a importância da modulação noradrenérgica do PMd, propomos no presente estudo uma investigação sistemática dos sítios noradrenérgicos que aferentam este núcleo.

2 OBJETIVO

Determinar os sítios noradrenérgicos que aferentam o núcleo pré-mamilar dorsal (PMd). Para tanto os animais receberam inicialmente uma injeção de um traçador retrógrado *Fluoro-Gold* (FG), e seis a oito dias após foram sacrificados, e seus encéfalos processados para a detecção dos sítios noradrenérgicos (identificados através da reação de imunofluorescência para detecção da tirosina hidroxilase – enzima passo limitante para síntese de catecolaminas). Os encéfalos foram analisados no sentido de identificar as possíveis fontes noradrenérgicas, bem como outras fontes catecolaminérgicas, que se projetam para o PMd através da identificação das células duplamente marcadas para tirosina hidroxilase e Fluoro-Gold.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 55 ratos machos adultos (Rattus norvegicus, linhagem Wistar) provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB - USP), pesando entre 250 e 300 g. Os animais foram acondicionados em biotério com ciclo claro/escuro de 12h, com início do período claro às 13h, temperatura de 23 °C e acesso livre a ração e água. Os procedimentos foram conduzidos com base no Protocolo de Ética adotado pela Universidade de São Paulo. Certificado 130/05/CEEA.

3.2 Injeções iontoforética do traçador retrógrado (Fluoro-Gold)

Injeções iontoforéticas de **Fluoro-Gold** foram inicialmente aplicadas no núcleo pré-mamilar dorsal.

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma solução de Equitesin (0,3 ml/100 g) e em seguida posicionados em aparelho estereotáxico onde receberam um depósito iontoforético unilateral de **Fluoro-Gold** no núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) [Coordenadas estereotáxicas: anteroposterior, -4.16 mm do bregma; látero-lateral, 0.4 mm do seio sagital; dorsoventral, −8.4 mm da superfície do encéfalo].

Os depósitos foram feitos através de micropipetas de vidro com diâmetro interno de ponta da ordem de 20 µm, mediante aplicação de +10 mA de corrente pulsátil (7s “on”, 7s “off”) durante 8 minutos, provida de uma fonte de corrente constante (Midgard Eletronics, Modelo CS3). Após o período de injeção, as micropipetas foram deixadas no local por 15 minutos para evitar o escoamento do traçador ao longo do trajeto da pipeta.

3.3 Perfusão e histologia

Após o período necessário para recuperação cirúrgica, captação e transporte do traçador (seis a oito dias), os animais foram profundamente anestesiados por via intraperitonial com uma solução de hidrato de cloral (Merck) 10% na proporção 0,4 ml/100 g de peso corpóreo, e em seguida, através de uma bomba peristáltica (Cole Parmer), foram perfundidos por via transcardíaca inicialmente com 150 ml de uma solução salina 0,9%, seguida de 900 ml de uma solução fixadora de paraformaldeído a 4% diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,4). Os encéfalos permaneceram nas caixas cranianas por 3h

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.

Em seguida, cortes frontais seriados, com 40 µm de espessura, foram obtidos utilizando-se um micrótomo de congelamento (Carl Zeiss). Os cortes foram colhidos sequencialmente em cinco compartimentos, de forma que a distância entre os cortes em um mesmo compartimento era de 200 µm.

3.4 Detecções imunohistoquímica do FG para revelação do local de injeção e mapeamento geral das células retrogradamente marcadas nos grupamentos catecolaminérgicos

Para detecção imunohistoquímica do FG, os cortes foram inicialmente incubados em uma solução de tampão potássio fosfato de sódio (KPBS) contendo Triton X-100 a 0,3%, soro normal de cabra a 2% e anticorpo anti-FG obtido em coelho (Ab-153/Chemical International) concentração de 1:5.000. Foram mantidos sob agitação constante a 4 °C durante 48h. O complexo antígeno-anticorpo foi localizado utilizando-se uma variação do sistema formado pelo complexo avidina-biotina (ABC) (HSU e RAINE, 1981). Assim, após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram incubados em uma solução contendo anticorpo biotinilado anti-coelho feito em cabra (Vector Laboratories) concentração de 1:200 em temperatura ambiente por 90 minutos e em seguida, colocados em uma solução contendo o composto avidina-biotina-HRP (ABC Elite Kit, Vector Laboratories) numa diluição de 1:200 por 90 minutos para ligar a peroxidase ao complexo antígeno-anticorpo. Na reação da imunoperoxidase, para a revelação do complexo antígeno-anticorpo foi utilizado basicamente o protocolo de Itoh et al. (1979). Resumidamente, os cortes foram incubados em uma solução de KPBS contendo 50 mg de tetrahidrocloreto de 3-3’diaminobenzidina-DAB (Sigma) e 40 mg de cloreto de amônia em 100 ml por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado β-D-glicose (Sigma) e a reação foi interrompida após um período variável de tempo. Após novas lavagens com KPBS, os cortes foram montados seqüencialmente em lâminas gelatinizadas cobertas com lamínulas utilizando DPX como meio de montagem. Cortes adjacentes foram corados pelo método de Níssl com tionina 0,25% como corante para servir como referência citoarquitetônica.

3.5 Análise imunohistoquímica da distribuição das fibras catecolaminérgicas no PMd

Para confirmar a existência de fibras positivas para tirosina hidroxilase no PMd, uma série de secções obtidas de um rato adulto foi preparada pelo método de imunoperoxidase para detecção de TH. Para tanto, os cortes foram incubados durante 48h em uma solução tampão de KPBS 0,02 M (pH 7.4) contendo anticorpo primário anti-tirosina hidroxilase (TH) monoclonal obtido em camundongo (Immunostar) concentração de 1:5000. Após este período, os cortes foram novamente lavados e incubados por 90 minutos em solução contendo anticorpo secundário biotinilado anti-camundongo obtido em cavalo (Vector Laboratories) concentração 1:200 e então processados pelo mesmo protocolo descrito para detecção imuno-histoquímica de Fluoro-Gold. Cortes adjacentes foram corados pelo método de Níssl com tionina 0,25% como corante para servir como referência citoarquitetônica.

3.6 Reação de dupla imuno-fluorescência para Fluoro-Gold (FG) e tirosina hidroxilase (TH)

Para detecção do FG, os cortes foram inicialmente incubados em uma solução de KPBS contendo Triton X-100 a 0,3%, soro normal de Burro a 2% e anticorpo anti-FG obtido em coelho (Ab-153/Chemical International) concentração de 1:5.000. Foram mantidos sob agitação constante a 4 °C durante 48h. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram incubados em uma solução contendo anticorpo biotinilado anti-coelho, feito em cabra (Vector Laboratories), concentração de 1:200 em temperatura ambiente por 120 minutos e em seguida, colocados em uma solução contendo estreptoavidina conjugado com composto fluorescente (CY^{TM}3- Jackson ImunoResearch, West Grove- EUA) (Amax=550 nm, Emax=570 nm). Na seqüência, os cortes foram lavados e processados para marcação de TH.

Assim, os cortes foram incubados durante 48 h em uma solução de tampão de KPBS 0,02 M (pH 7.4) contendo anticorpo primário anti-tirosina hidroxilase monoclonal obtido em camundongo (Immunostar) concentração de 1:5000. Após este período, os cortes foram novamente lavados e incubados por 120 minutos em solução contendo anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a composto florescente (CY^{TM}2- Jackson ImunoResearch, West Grove- EUA) (Amax=492 nm, Emax 510 nm), obtido em burro. Após novas lavagens com KPBS, os cortes foram montados seqüencialmente em lâminas gelatinizadas cobertas com lamínulas utilizando antifade (Invitrogen) como meio de montagem. Posteriormente foram

armazenadas protegidas da luz a -20 ºC. Cortes adjacentes foram corados pelo método de Níssl com tionina 0,25% como corante para servir como referência citoarquitetônica.

3.7 Análise do material

3.7.1 Microscopia de campo claro: Desenhos em Câmera Lúcida

Os cortes processados imunohistoquimicamente para o mapeamento geral da distribuição das células retrogradamente marcadas nos sítios catecolaminérgicos foram observados em microscópio Nikon Eclipse E400 equipado com câmera lúcida Nikon Y-DT, através do qual foram realizados desenhos para representação da distribuição das células retrogradamente marcadas nos sítios catecolaminérgicos.

3.7.2 Microscopia de Epifluorescência

Os cortes reagidos pelo método de dupla-fluorescência foram analisados utilizando-se um microscópio Nikon Eclipse 80i equipado com epifluorescência e uma câmera digital Nikon DXM 1200F, onde foram observadas as células retrogradamente marcadas, as células imuno positivas para TH e as células duplamente marcadas.

3.7.3 Fotomicrografias

Tanto o material processado imunohistoquimicamente, quanto os cortes reagidos pelo método de dupla-fluorescência, foram documentados fotograficamente com um microscópio Nikon Eclipse 80i equipado com epifluorescência e uma câmera digital Nikon DXM 1200F.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação da Inervação TH positiva no PMd

Uma série de secções obtidas de um rato adulto foi preparada pelo método de imunoperoxidase para detecção de TH. Após o processamento, foi examinado toda a extensão do PMd através de microscopia de campo claro e escuro. A figura 2A ilustra o padrão de inervação do núcleo, demonstrando que o PMd possui um número relativamente pequeno de fibras TH imunorreativas, as quais são mais visíveis nas porções mais ventrais do núcleo.

4.2 Identificação das aferências TH positivas para o PMd

Foram obtidos seis casos com depósitos de Fluoro-Gold relativamente circunscritos ao núcleo pré-mamilar dorsal, sendo o padrão de marcação retrógrada semelhante entre eles. Foi selecionado um caso cujo sítio de injeção imunorreagido para detecção de Fluoro-Gold está ilustrado em campo claro na figura 3A. Uma questão a ser considerada neste ponto é o sítio efetivo de captação do traçador. Durante o período de sobrevida, ocorre difusão do traçador formando um alo ao redor do seu depósito, que corresponde ao sítio efetivo de captação do mesmo. No corte reagido imunohistoquimicamente (Figura 3A), temos o depósito do traçador englobando uma área que é bem maior do que o seu sítio efetivo de captação. Para tanto, ilustramos na figura 4 um corte não reagido, mostrando apenas a fluorescência do depósito de FG, onde podemos evidenciar claramente a região central do depósito (que corresponde ao sítio ativo de captação) e a região do alo. Nota-se que a concentração do traçador na região do alo é insuficiente para garantir marcação retrógrada adequada.

No mapeamento geral utilizando-se os cortes reagidos imunohistoquimicamente para a detecção das células retrogradamente marcadas pelo FG, examinamos todos os sítios catecolaminérgicos, a saber, os sítios Noradrenérgicos (A1- A7), Dopaminérgicos (A8-A14) e Adrenérgicos (C1-C3). Nestes sítios, a vasta maioria das células retrogradamente marcadas foi encontrada no *locus ceruleus* (Figuras 3B, 5 e 6A) e apenas poucas células foram ocasionalmente encontradas no território do grupamento noradrenérgico A5. Nenhum dos outros territórios catecolaminérgicos apresentou marcação retrógrada. Na figura 5, representamos através de desenhos feitos em câmara lúcida a distribuição das células

retrogradamente marcadas ao longo da extensão do *locus ceruleus* e região periventricular pontina adjacente.

Utilizando o método de dupla-fluorescência para detecção imunohistoquímica de Fluoro-Gold (FG) e tirosina hidroxilase (TH), voltamos a examinar todos os grupamentos catecolaminérgicos afim de identificar as possíveis fontes de inervação catecolaminérgica ao PMd. Nesta análise, confirmamos que dentre os grupamentos catecolaminérgicos, células retrogradamente marcadas são encontradas apenas no *locus ceruleus*, sendo a grande maioria destes neurônios também imunorreativos para TH (Figura 6).

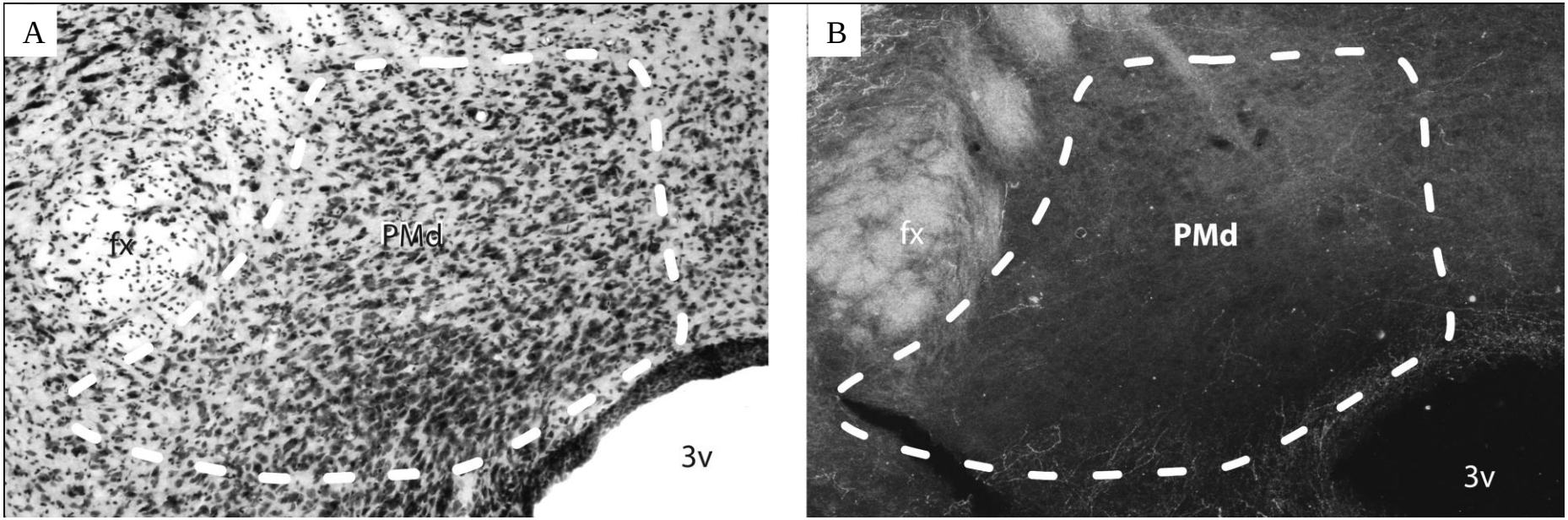

Figura 2. (A) Fotomicrografia em campo claro de um corte frontal ao nível do PMd, corada pelo método de Nissl. (B) Fotomicrografia em campo escuro de corte imediatamente adjacente ao ilustrado anteriormente, imunorreagido para a detecção de Tirosina Hidroxilase. Abreviações: 3V (Terceiro ventrículo), fx (fórnice), PMd (núcleo pré-mamilar dorsal)

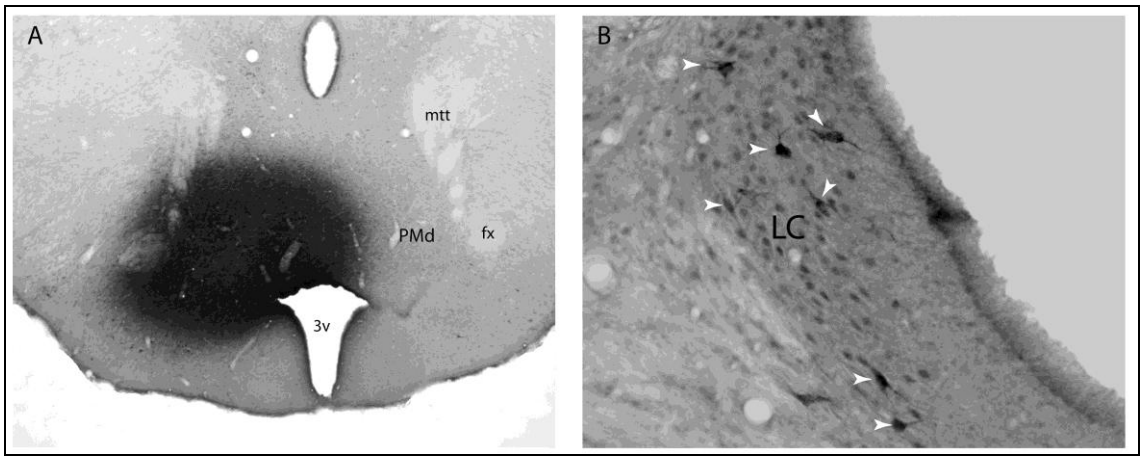

Figura 3. (A) Fotomicrografia em campo claro de corte frontal imunorreagido para a detecção de Fluoro Gold ilustrando o local de injeção do traçador. (B) Fotomicrografia em campo claro de corte frontal imunorreagido para a detecção de Fluoro Gold ilustrando células retrogradamente marcadas (indicadas pelas setas brancas) localizadas no *Locus ceruleus*. Abreviações: 3V (Terceiro ventrículo), fx (fórnice), LC (*locus ceruleus*), mtt (trato mamilo-talâmico), PMd (pré-mamilar dorsal)

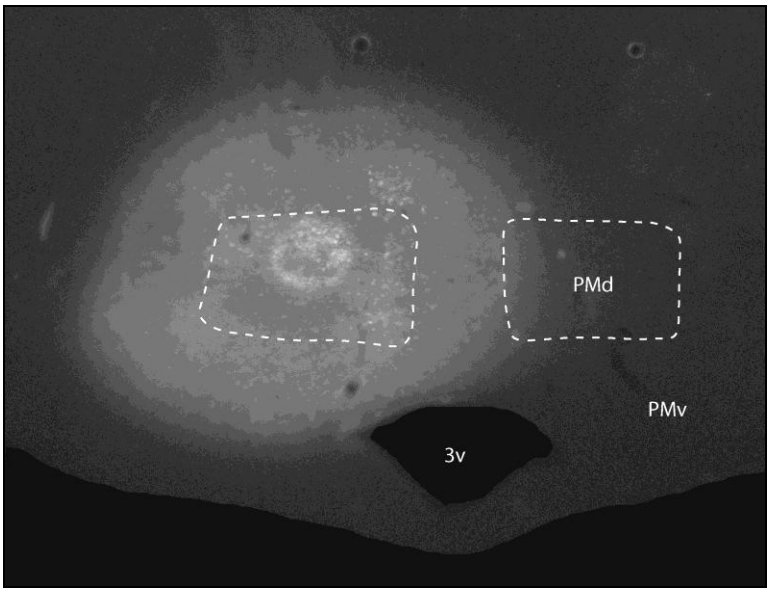

Figura 4. Fotomicrografia utilizando epifluorescência de corte frontal ilustrando o local de injeção do traçador no experimento 25 (centro de injeção e alo). Corte não reagido, visualizado através da fluorescência do traçador. Abreviações: 3V (Terceiro ventrículo), PMd (pré-mamilar dorsal), PMv (pré -mamilar ventral).

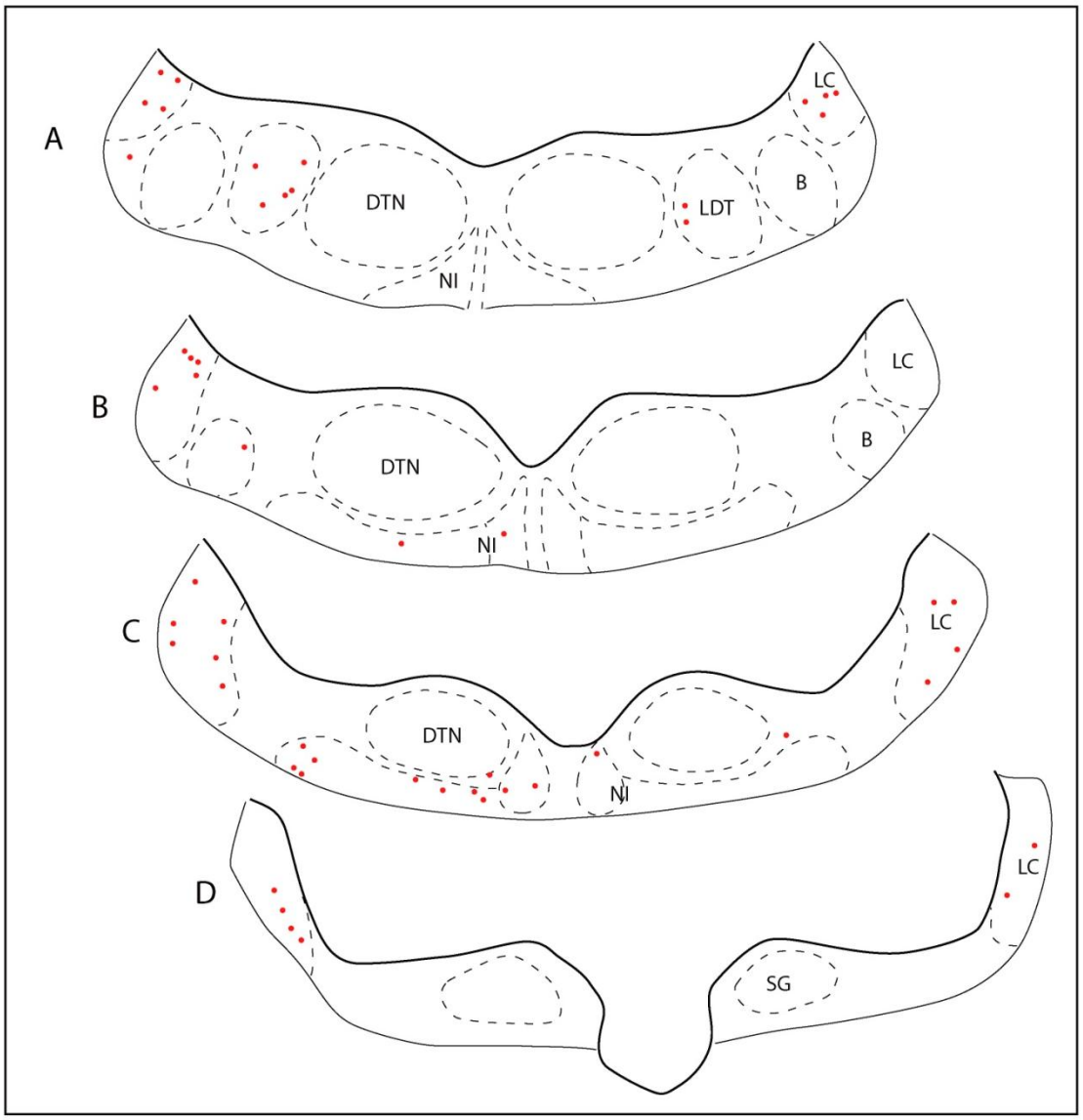

Figura 5. (A-D) Desenhos feitos em câmara lúcida d o experimento 25 da região periventricular pontina arranjadas no sentido rostro-caudal (de **A** para **D**) ilustrando a distribuição das células retrogradamente marcadas (indicadas como pontos vermelhos) ao longo de toda a extensão do *Locus ceruleus*. Abreviações: B (núcleo de Barrington), DTN (núcleo tegmental dorsal), LC (*locus ceruleus*), LDT (núcleo tegmental laterodorsal), NI (núcleo incerto), SG (núcleo supragenual).

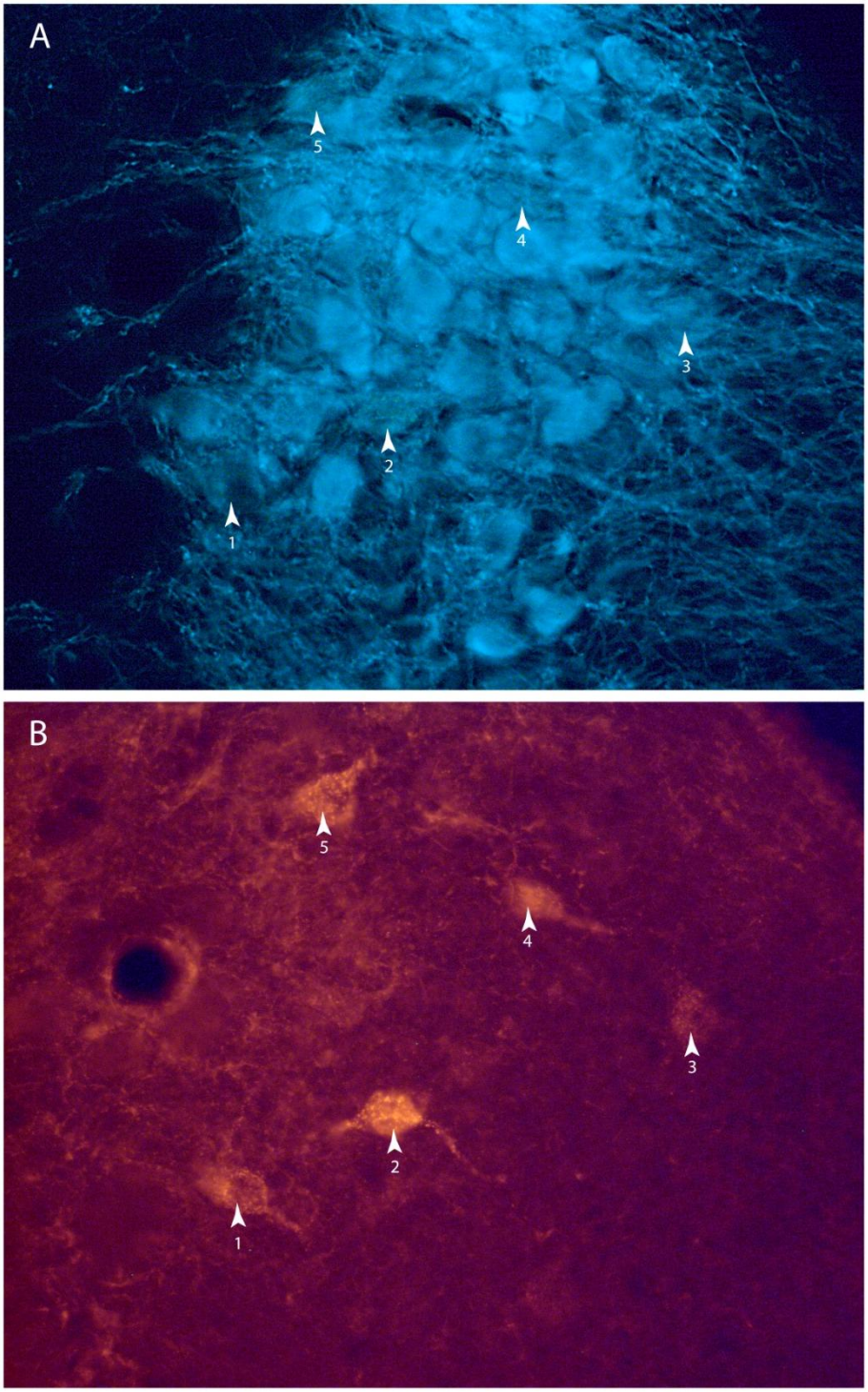

Figura 6. (A) Fotomicrografia utilizando epifluorescência de corte frontal ao nível do LC ilustrando células imunopositivas para tirosina hidroxilase. (B) Fotomicrografia em epifluorescência de corte frontal imunorreagido para a detecção de Fluoro Gold ilustrando células retrogradamente marcadas no *Locus ceruleus*. Para orientação, setas e números foram colocados para indicar o posicionamento das células duplamente marcadas.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho mostramos inicialmente que o PMd possui um plexo relativamente esparso de fibras catecolaminérgicas que se encontra disperso pelo núcleo, sendo que a maior concentração é observada em sua porção ventral. Os resultados de nossos experimentos de rastreamento retrógrado, aliados a marcação dos grupamentos catecolaminérgicos revelaram que o *locus ceruleus*, considerado o principal grupamento noradrenérgico, apresentou um pequeno, porém considerável, número de células duplamente marcadas, sugerindo que as fibras catecolaminérgicas que se projetam ao PMd são basicamente oriundas deste núcleo.

De acordo com Do Monte et al. (2008), beta-bloqueadores de ação central (propranolol) administrados sistemicamente reduzem drasticamente a ativação do PMd, assim como as respostas de defesa incondicionadas ao odor do gato. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que a aplicação local de agente beta-bloquedor (atenolol) no PMd reduziu as respostas de defesa durante a exposição direta ao odor de gato e também as respostas contextuais ao ambiente pareado ao odor de gato testadas no dia seguinte. Além disso, como já mencionado, estudos prévios reportaram que o *locus ceruleus* está particularmente mobilizado durante a exposição ao predador ou ao seu odor (DIELENBERG et al., 2001; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005).

Corroborando o papel da neurotransmissão noradrenégica central durante a exposição a ameaças predatórias, Pavesi et al. (2010) reportaram que a estimulação beta adrenérgica do PMd (possivelmente através de receptores beta 1) foi capaz de induzir condicionamento aversivo quando pareada a um odor neutro de Acetato de Amila.

Levando-se em conjunto os achados da presente investigação e as informações da literatura, poderíamos esperar que lesões do *locus ceruleus* interferissem de forma crítica nas respostas anti-predatórias, e para tanto, experimentos que envolvam lesões ou inativações deste sítio neural seriam de extrema importância para elucidar o papel dessa estrutura durante o comportamento defensivo. Assim, na tentativa de endereçar esta questão, experimentos feitos em nosso laboratório mostraram que as lesões ou inativações do *locus ceruleus* são particularmente complexas devido ao acometimento de estruturas vizinhas, como o núcleo de Barington (o centro de micção pontina) e os núcleos vestibulares. Notamos também que os animais com lesões do *locus ceruleus* normalmente apresentam sérios déficits vestibulares, assim como retenção urinária severa, levando a um quadro de debilidade que dificulta a avaliação destes animais nos testes comportamentais.

Por fim, considerando o papel crítico que a transmissão noradrenérgica exerce no PMd para o desencadeamento das respostas anti-predatórias, esperávamos uma inervação

noradrenérgica mais conspícua neste sítio neural. Desta forma, especulamos que além da projeção direta do *locus ceruleus*, o PMd poderia ser alvo da noradrenalina e/ou adrenalina circulante, as quais provavelmente exerceriam a principal influência catecolaminérgica para o núcleo. Entretanto, a barreira hemato-encefálica limita tanto a entrada de noradrenalina no cérebro de mamíferos, quanto de seu precursor, a dopamina (WEIL-MALEERBE, 1961; GLOLWINSKI e BALDESSARINI, 1966). Ainda considerando o fato que o PMd é alvo de um número relativamente pequeno de células e é inervado por poucas fibras catecolaminérgicas, poderíamos supor que a noradrenalina não exerceria seu papel no PMd como neurotransmissor clássico, mas sim como modulador da transmissão sináptica de outros neurotransmissores, como por exemplo, o glutamato (WOODWARD et al., 1991). Embora esta hipótese seja plausível, os dados de Pavesi et al. (2010) dão suporte a hipótese de uma ação direta da noradrenalina como neurotransmissor clássico nos receptores adrenérgicos beta-1 e que a semelhança de um estímulo predatório pode ser utilizada como um estímulo incondicionado eficiente para promover condicionamento aversivo a estímulo olfatório neutro.

A atividade do LC varia de acordo com o nível de alerta, apresentando alta freqüência de disparos durante a vigília, diminuindo durante a sonolência e está praticamente silenciado durante o sono paradoxal (ASTON-JONES et al., 1981, 1999). A freqüência de disparos dos neurônios do LC também é reduzida quando os animais aparentemente estão desatentos a pistas ambientais, como durante os comportamentos de ingestão e auto limpeza (ASTON-JONES et al.,1981, 1988, 1999). Sua atividade é potencialmente elevada por grande variedade de estímulos estressores (BREMNER et al.,1996), assim como por estímulos sensoriais visuais, auditivos, e táteis (ASTON-JONES et al., 1981) aumentado o nível de atenção e influenciando a resposta comportamental. Em resumo, o LC é responsivo a eventos novos no ambiente e a resposta é potencializada de acordo com a relevância do estímulo, mas ainda não sabemos ao certo as vias que medeiam estas respostas. Especificamente, as pistas relativas à presença do predador seriam sinalizadas ao LC como um evento novo e altamente relevante, aumentado potencialmente sua atividade e este liberando noradrenalina no PMd, que está sinalizando especificamente a presença ou contexto do predador, seria crítico para amplificar ou deflagrar a resposta de defesa.

Em conjunto, estes dados sugerem que embora poucas células do LC ofereçam um modesto contingente de fibras ao PMd, seriam estes os responsáveis por todo o suporte noradrenérgico de crucial importância para expressão completa do comportamento de defesa frente a ameaças predatórias e para o processo de consolidação de memória contextual e estes

eventos. Permanece assim para ser elucidado, mostrando a necessidade de determinar a densidade de receptores catecolaminérgicos no núcleo, as alterações dos níveis catecolaminérgicos durante as interações predatórias.

Entendemos desta forma que os nossos achados são particularmente interessantes no sentido de ampliar o entendimento das possíveis vias de ação dos sistemas catecolaminérgicos nas respostas anti-predatórias.

6 CONCLUSÃO

Levando em consideração os resultados obtidos no presente trabalho, concluímos que a única fonte de aferências catecolaminérgicas para o núcleo pré-mamilar dorsal é oriunda do *locus ceruleus*, onde encontramos um número conspícuo de células duplamente marcadas, indicando ser este o responsável pelo suporte noradrnérgico ao PMd.

REFERÊNCIAS[*]

AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. **Journal of Neuroscience Research,** v. 87, p. 2418–2429, 2009.

ANGRINI, M.; LESLIE, J. C.; SHEPHARD, R. A. Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 59, p. 387–397, 1998.

ASTON-JONES, G.; BLOOM, F. E. Activity of norepinephrine-containing locus ceruleus neurons in behaving rats anticipat es fluctuations in the sleep-waking cycle. **J. Neurosci.**, v. 1, p. 876-886, 1981.

ASTON-JONES, G.; ALEXINSKY, T.; GRANT, S. Activity of locus ceruleus neurons in behaving primates: relationship with vigilance. **Soc. Neurosci. Abstr.**, v. 14, p. 407, 1988

ASTON-JONES, G.; RAJKOWSKI, J.; COHEN, J. Role of locus ceruleus in attention and ehavioral flexibility. **Biol. Psychiatryn**. v. 46, n. 9, p. 1309-1320, 1999.

AUDI, E. A.; DE OLIVEIRA, R. M.; GRAEFF, F. G. Microinjection of propranolol into the dorsal periaqueductal gray causes an anxiolytic effect in the elevated plus-maze antagonized by ritanserin. **Psychopharmacology.** v. 105, n. 4, p. 553-557

BITTECOURT, A. S.; CAROBREZ, A. P.; ZAMPROGBO, L. P.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L. S. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of *N*-METHYL-D -aspartic acid glutamate receptors. **Neuroscience**, v. 125, n. 1, p. 71-89, 2004.

BLANCHARD, D. C.; MARKHAM, C.; YANG, M.; HUBBARD, D.; MADARANG, E.; BLANCHARD, R. J. Dorsal premammillary nucleus differentially modulates defensive behaviors induced by different threat stimuli in rats. **Neurosci. Lett.**, v. 345, p. 145-148, 2003.

---

[*] **De acordo com:**

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

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; HORI, K. An ethoexperimental approach to the study of defense. In: BLANCHARD, R. J.; BRAIN, P. F.; BLANCHARD, D. C.; PARMIGIANI, S. (Ed.). **Ethoexperimental approaches to the study of behavior**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishing, 1989. p. 114–136.

BREMNER, J. D.; KRYSTAL, J. H.; SOUTHWICK, S. M.; CHARNEY, D. S. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety I: Preclinical studies. **Synapse**, v. 23, n. 1, p. 28-38, 1996.

BRUNELLO, N.; DEN BOER, J. A.; JUDD, L. L.; KASPER, S.; KELSEY, K. E.; LADER, M.; LECRUBIER, Y.; LEPINE, J. P.; LYDIARD, R. B.; MENDLEWICZ, J.; MONTGOMERY, J. A.; RACAGNI, G.; STEIN, M. B.; WITTCHEN, H. U. Social phobia: diagnosis and epidemiology, neurobiology and pharmacology, comorbidity and treatment. **Journal of Affective Disorders**, v. 60, p. 61–74, 2000.

CANTERAS, N. S.; CHIAVEGATTO, S.; VALLE, L. E.; SWANSON, L. W. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. **Brain Res. Bull**, v. 44, n. 3, p. 297-305, 1997.

CANTERAS, N. S.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; COMOLI, E. Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 25, p. 661-668, 2001.

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

CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammilary body. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, n. 21, p. 10089-10093, 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, p. 41-79, 1994.

CARVALHO-NETTO, E. F.; MARTINEZ, R. C.; BALDO, M. V.; CANTERAS, N. S. Evidence for the thalamic targets of the medial hypothalamic defensive system mediating emotional memory to predatory threats. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 93, p. 479–486, 2010.

CEZARIO, A. F.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; BALDO, M. V.; CANTERAS, N. S. Hypothalamic sites responding to predator threats - the role of the dorsal premammillary

nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. **Eur. J. Neurosci.**, v. 28, p. 1003-1015, 2008.

DAHLSTOM, A. E.; FUXE, L. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiol. Scand. Suppl**., v. 232, p. 1–55, 1964.

DIELENBERG, R. A.; HUNT, G. E.; MCGREGOR, I. S. When a rat smells a cat: the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience**, v. 104, p. 1085–1097, 2001.

DO MONTE, F. H. M.; CANTERAS, N. S.; FERNANDES, D.; ASSREUY, J.; CAROBREZ, A. P. New perspectives on β-adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 49, p. 13296–13302, 2008.

FERNANDEZ DE MOLINA, A.; HUNSPERGER, W. Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. **J. Physiol.**, v. 160, p. 200-213, 1962.

GILES, J. Beta-blockers tackle memories of horror. **Nature**, v. 436, n. 28, p. 448-449, 2005.

GLOWINSKI, J.; BALDESSARINI, R. J. Metabolism of norepinephrine in the central nervous system. **Pharmacological Reviews**, v. 18, n. 4, p. 1201-1238, 1966.

GORMAN, A. L.; DUNN, A. J. Beta-adrenergic receptors are involved in stress-related behavioral changes. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 45, n. 1, p. 1-7, 1993.

GOTO, M.; CANTERAS, N. S.; BURNS, G.; SWANSON, L. W. Projections from the subfornical region of the lateral hypothalamic area. **J. Comp. Neurol.**, v. 493, p. 412–438. 2005.

HIRSCHMANN, S.; DANNON, P. N.; IANCU, I.; DOLBERG, O. T.; ZOHAR, J.; GRUNHAUS, L. Pindolol augmentation in patients with treatment-resistant panic disorder: A double-blind, placebo-controlled trial, **J. Clin. Psychopharmacol.**, v. 20, n. 5, p. 556-559, 2000.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin and biotin in immunohistochemistry. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29, p. 1349-1353, 1981.

ITOH, K.; KONISH, A.; NOMURA, S.; MIZUNO, N.; NAKAMURA, Y.; SUGIMOTO, T. Aplication of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of the horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. **Brain. Res.**, v. 175, p. 341-346, 1979.

LEDOUX, J. E.; IWATA, J.; CICCHETTI, P.; REIS, D. J. Different projections of the central Amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of condiotioned fear. **The Journal of Neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 2517-2529, 1988.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 23, p. 155-184, 2000.

LI, C. I.; MAGLINAO, T. L.; TAKAHASHI, L. K. Medial amygdala modulation of predator odor-induced unconditioned fear in the rat. **Behav. Neurosci**., v. 118, p. 324-332, 2004.

LINDVALL, O.; BJÖRKLUND, A. Dopamine-and Norepinephrine- Containing Neuron System: Their Anatomy in the Rat Brain. **Chemical Neuroanatomy**, p. 229-255, 1983.

MAEDA, T. The locus ceruleus: history. **J. Chem. Neuroanat**., v. 18, p. 57-64, 2000.

MARTINEZ, R. C.; CARVALHO-NETTO, E. F.; AMARAL, V. C.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTERAS, N. S. Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. **Behav. Brain Res.**, v. 192, p. 185–190, 2008.

MARTINEZ, R.C.; CARVALHO-NETTO, E. F.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; BALDO, M. V. C.; CANTERAS, N. S. Amygdalar roles during exposure to a live predator and to a predator-associated context. **Neuroscience,** 2010. In press.

MCDONALD, A. J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Prog. Neurobiol.**, v. 55, p. 257-332, 1998.

MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annu. Rev. Neurosci**., v. 27, p. 1-28, 2004.

MOORE, R. Y.; CARD, J. P. Noradrenaline-containing neuron systems. In: **Handbook of chemical neuroanatomy**, vol. 2: Classical transmiters in the CNS, part 1A. Amsterdam, Björklund and T. Hökfelt, Elsevier, p. 123-156, 1984.

MORILAK, D. A.; BARRERA, G.; ECHEVARRIA, D. J.; GARCIA, A. S.; HERNANDEZ, A.; MA, S.; PETRE, C. O. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, v. 29, n. 8, p. 1214-1224, 2005.

MOTTA, S. C.; GOTO, M.; GOUVEIA, F. V.; BALDO, M. V. C.; CANTERAS, N. S. Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. **PNAS**, v. 106, n. 12, p. 4870-4875, 2009.

PAVESI, E.; CANTERAS, N. S.; CAROBREZ, A. P. Acquisition of Pavlovian fear conditioning by beta-adrenoceptor activation of the dorsal premammillary nucleus in rats. **Neuroscience Pharmacology**, 2010. In press.

PALKOVITS, M.; JACOBOWITZ, D. M. Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the rat brain. II. Hindbrain (mesencephalon, rhombencephalon). **J. Comp. Neurol.**, v. 157, n. 1, p. 29-42, 1974.

PETROVICH, G. D.; CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. **Brain Res. Rev.**, v. 38, p. 247-289, 2001.

RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S.; CEZARIO, A. F.; BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. An alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 29, 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, p. 1–40, 1994.

RISOLD, P. Y; SWANSON, L. W. Connections of the rat lateral septal complex. **Brain Res. Rev.**, v. 24, p. 115–195, 1997.

ROGAN, M. T.; LEDOUX, J. E. Emotion: System, Cells, Synaptic Plasticity. **Cell**, v. 85, p. 469–475, 1996.

SHI, C. J.; CASSELL, M. D. Perirhinal cortex projections to the amygdaloid complex and hippocampal formation in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 406, p. 299-328, 1999.

SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 270, p. 209–242, 1988.

STAPLES, L. G.; MCGREGOR, I. S.; APFELBACH, R.; HUNT, G. E. Cat odor, but not trimethylthiazoline (fox odor), activates accessory olfactory and defense-related regions in rats. **Neuroscience**, v. 151, p. 937-947, 2008.

SWANSON, L. W.; HARTMAN, B. K. The central system. An immunofluorescence study of the cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. **J. Comp. Neurol.**, v. 163, n. 4, p. 467-505, 1975.

SWANSON, L. W. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. **Brain Res.**, v. 886, p. 113-164, 2000.

TAKAHASHI, L. K.; HUBBARD, D. T.; LEE, I.; DAR, Y.; SIPES, S. M. Predator odor induced conditioned fear involves the basolateral and medial amygdala. **Behav. Neurosci.**, v. 121, p. 100–110, 2007.

VAIVA, G.; DUCROCQ, F.; JEZEQUEL, K.; AVERLAND, B.; LESTAVEL, P.; BRUNET, A.; MARMAR, C. R. Immediate treatment with propranolol decreases posttraumatic stress disorder two months after trauma. **Biol. Psychiatry**, v. 54, p. 947–949, 2003.

WOODWARD, D. J.; MOISES, H. C.; WATERHOUSE, B. D.; YEH, H. H.; CHEUN, J. E. Modulatory actions of norephinephrine on neural circuits. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 287, p. 193-208, 1991.

WEIL-MALHERBE, H.; WHITBY, L.O.; AXELROD, J. The blood-brain barrier for catecholamines in different regions of the brain. In: KETY, S. S. and Elkes, J. (Ed.). **Regional Neurochemistry**. Oxford: PergamonPress, 1961. p. 284-292