MIGUEL ANTONIO XAVIER DE LIMA

**Investigação da circuitaria cortical envolvida no
processamento do medo contextual à ameaça predatória**

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

São Paulo
2015

MIGUEL ANTONIO XAVIER DE LIMA

**Investigação da circuitaria cortical envolvida no
processamento do medo contextual à ameaça predatória**

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

Lima, Miguel Antonio Xavier de.

Investigação da circuitaria cortical envolvida no processamento do medo contextual à ameaça predatória / Miguel Antonio Xavier de Lima.
-- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Newton Sabino Canteras.

Tese (Doutorado) – 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: Study of the cortical circuitry underlying contextual fear processing to predatory threat.

1. Memória 2. Comportamento animal 3. Córtex cerebral 4. Tálamo
5. Medo 6. Neurociência 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/SBIB0134/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Miguel Antonio Xavier de Lima.

Título da Tese: Investigação da circuitaria cortical envolvida no processamento do medo contextual à ameaça predatória.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **085** nas fls. **130** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Newton Sabino Canteras**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Bases Neurais dos comportamentos motivados*" do qual participam o(s) aluno(s), **Isadora Clivatti Furigo**, **Miguel José Rangel Junior**, **Miguel Xavier de Lima**, **Wagner Fernandes de Oliveira** e as pesquisadoras **Claudia de Brito Faturi** e **Simone Cristina Motta**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **24.08.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 28 de agosto de 2012.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Aos meus pais, Antonio e Roseli, e minha irmã Fernanda, os quais têm sido a minha tríade de esteios que tangem a motivação no trabalho, amor e respeito à vida. Para eles, minha eterna lealdade e gratidão.

Tributo ainda esta obra científica em memória de cada animal, que, com cada sinapse, foi indubitavelmente medular na produção do conhecimento aqui gerado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador, Prof. **Newton S. Canteras**, que foi peça chave desta tese e que conduziu de forma brilhante a propriedade científica deste trabalho, sempre muito disponível e paciente para todas as dúvidas que surgiram (e surgem) a todo momento. A hospitalidade com que me recebeu foi de suma importância pra que me sentisse seguro. Assim, as condições criadas foram preponderantes para que eu pudesse executar meu trabalho com segurança e com a melhor qualidade possível. A conclusão de um trabalho como esse me faz perceber que, ser orientador, não é apenas reforçar positivamente os acertos, mas motivar constantemente (por anos!) a busca pelo conhecimento e sempre chamar a atenção, quando por vezes, eu me encontrava profissionalmente perdido e desmotivado. Espero ter retribuído a altura. Deixo aqui registrado minha eterna admiração pelo pesquisador que é, e meu muito obrigado pela amizade e imenso conhecimento que me fora transmitido.

À **Universidade de São Paulo**, e em especial ao **Instituto de Ciências Biomédicas** e ao **Departamento de Anatomia**, por toda infraestrutura material e pessoal, indispensáveis para a execução deste projeto.

Meu sincero agradecimento ao Prof. e amigo **Roelf Cruz Rizzolo**, o qual é certamente o responsável por ter me iniciado na carreira acadêmica e por ter aguçado em mim a curiosidade pelo cérebro. Ao longo dos 5 anos de iniciação científica em seu laboratório, aprendi na essência e na prática as características desejáveis de um profissional da ciência. Sempre de conduta muito séria, extremamente cética e criteriosa, me deu a oportunidade e despertou o interesse por leituras antes nunca pensadas, de questionamentos outrora nunca feitos. Me mostrou que a ciência é palatável e que é a melhor ferramenta que temos para a produção do conhecimento, e que as verdades não são absolutas (cientistas estão frequentemente errados).

Aos meus pais, **Antonio** e **Roseli**, pelo suporte emocional inquestionável que me manteve por anos a fio focado em um objetivo. Não tenho palavras por toda compreensão e motivação com que me guiaram a exatos 538 km de distância, com infrequentes visitas mensais. Ao meu pai, sonhador perene, um visionário e melhor amigo, que me guiou com maestria e seriedade por todos esses anos, e que me ensinou na prática que só podemos vencer através do trabalho. À minha mãe, por ser um esteio de força e amor, pelas 365 ligações ao ano, por ser sempre tão presente, e por toda a empatia que me doou desde sempre. O título que este trabalho me confere ao final desta etapa, é nosso. Estendo ainda os agradecimentos a minha irmã Fernanda, vó Anna, e meus avós Miguel e Laura, por todo amor, amizade e cuidado.

À Prof^a **Simone Motta**, grande amiga e consultora científica. As intermináveis terapias profissionais e pessoais me ensinaram a erguer a cabeça, olhar para frente, e acreditar em mim mesmo quando alguma coisa saía do trilho. Divido e compartilho com ela a alegria da conclusão deste trabalho.

Ao Professor **Cláudio Casatti**, pela amizade, conhecimento transmitido desde a graduação, e por ter me incentivado na carreira acadêmica. Agradeço especialmente por ter feito o primeiro contato e por ter me indicado ao Prof. Newton.

Aos meus mentores de anatomia de cabeça e pescoço, Professores **Américo de Oliveira e Rogério Buchaim**. Muito obrigado pelo imensurável conhecimento transmitido, por todas as oportunidades, pela grande amizade ao longos desses anos desde a Faculdade de Odontologia, e pela preocupação com meu progresso profissional.

Ao Professor **Marcus Vinícius Baldo**, pela eficiência, destreza e disposição aplicada nas análises estatísticas do presente trabalho.

Aos professores e amigos, **Edilson Ervolino, Paulo Botacin, Francisco Clascá, Renata Frazão e Junqueira**, pelo valioso conhecimento acadêmico e oportunidades que permitiram minha melhoria profissional.

Aos professores **Jackson Bittencourt, Renata Frazão, Sara Shammah-Lagnado, Luciano Felício e Marucia Chacur**, por terem aceitado de prontidão e terem feito um ótimo trabalho em meus exames de qualificação.

À **Amanda Oliveira e Maria Cristina**, pelo indispensável apoio técnico laboratorial e administrativo (financeiro), respectivamente, por serem extremamente competentes em suas funções e pela amizade nesses anos.

Aos funcionários do **Biotério do Departamento de Anatomia, Patrícia** (secretária da pós-graduação), aos **técnicos do bloco didático de Anatomia**, pelo trabalho exercido com seriedade e responsabilidade.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, instituição que me forneceu apoio financeiro através dos Processos 2011/01860-8 (bolsa de mestrado) e 2013/04802-4 (bolsa de doutorado direto), indispensáveis para a execução do trabalho, bem como para a participação em eventos científicos.

Aos atuais e antigos integrantes do Laboratório de Neuroanatomia Funcional, **Rodrigo, Isadora, Wagner, Juliette, Kélvia, Carlos (Chile)**, pela compreensão e pela oportunidade da convivência.

Aos colegas e amigos do Departamento de Anatomia, **Ana Takano, Marina Fevereiro, Natália Senger, Marina Silveira, Milena, Marcos, Jodonai, Luiz Bozi, Ismael, Tábata (s), Kátia, Camila, Eloá, Giovanni, Vanessa Lima, Carol Lino, Carlos H., Mike, Manuela, João Oliveira, Daniel, Fábio**, pelas tantas horas de convivência, confraternizações e momentos de descontração.

Aos amigos de família **Kiko e Rose, Agenor e Lourdes, Martha e Timba**, por todo apoio.

Aos amigos que ganhei em SP, **Bruno Cruz, Leonardo Suman, Clayton, Augusto, Luciano, André, João Gimenes e Ricardo Bindi**, pela companhia e incontáveis momentos.

Aos companheiros de longa data da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP), **Caril, Gestter, Carol Cabral, Gustavo Morelli, Fernando Moreno, Rafael Guimarães**, pela amizade muitas vezes virtual, no entanto frequentemente presente e indispensável.

À minha família local e companheiros de moradia pela agradável rotina de amizade e cumplicidade, **Guilherme Garbino, Diogo, João Paulo, Carlos Flores, Danilo, e Léo**.

Agradecimentos especiais ao **Miguel Rangel, Cristina Fürstenau, Cleyton, Ivson**, por terem me confiado um verdadeiro sentimento de amizade, dotado de carinho, compreensão, e totalmente despretenso.

E por fim, àqueles que foram verdadeiros agentes facilitadores de uma vida longe da comodidade, segurança e conforto da família. Por serem os amigos que são, mais do que presentes, exemplos de profissionais, e que por incontáveis vezes não mediram esforços para saírem de suas zonas de conforto e tentar estampar um sorriso em meu rosto. **Diego Cury, João Batista, Vânios e Waldemar**.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

“Existem muitas hipóteses na ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente correto; elas são a abertura para descobrir o que é certo. A ciência é um processo autocorretivo. Para serem aceitas, novas ideias devem sobreviver aos mais rigorosos padrões de evidência e escrutínio.”

Carl Sagan (1934 – 1996)

RESUMO

LIMA, M. A. X. de. **Investigação da circuitaria cortical envolvida no processamento do medo contextual à ameaça predatória.** 2015. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A parte ventral do núcleo anteromedial do tálamo (AMv) recebe densas projeções do núcleo pré-mamilar dorsal (PMd), o sítio hipotalâmico mais responsivo às ameaças predatórias. Estudos indicam que lesões neuroquímicas no AMv interferem no processamento da memória aversiva predatória sem no entanto influenciar respostas de defesa inatas na exposição direta a um predador. O escopo deste trabalho foi inicialmente determinar se o AMv está envolvido na aquisição e/ou expressão das respostas condicionadas de medo, através da inativação deste núcleo com muscimol em tempos específicos do teste comportamental. Na sequência, nós examinamos quais áreas do córtex cerebral são aferentadas pelo AMv (através de estudo de rastreamento anterógrado com a leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris*; PHA-L) e se essas áreas corticais estão interconectadas entre si (através de rastreamento anterógrado com o amino-dextrano biotinilado; BDA). Investigamos através da expressão de Fos a ativação diferenciada das áreas corticais aferentadas pelo AMv durante a exposição predatória, e finalmente, através de lesões neuroquímicas bilaterais pela infusão de N-metil D-Aspartato (NMDA), se estas áreas corticais aferentadas pelo AMv estão envolvidas no processamento da memória aversiva. No primeiro experimento observamos que a inativação do AMv antes da exposição ao predador causa déficits significativos na resposta de medo contextual (e também diminui drasticamente a expressão de Fos no PMd e na porção dorsolateral da matéria cinzenta periaquedutal, que acompanham as respostas contextuais anti-predatórias). A inativação do núcleo antes da exposição ao contexto predatório não interferiu na expressão das respostas de medo aprendidas. Em conjunto estes dados sugerem que o AMv esteja envolvido na aquisição, e não na expressão, do condicionamento contextual ao predador. As áreas corticais pré-límbica (PL), área cingulada anterior (ACA), área visual anteromedial (VISam) e parte ventral da área retrosplenial (RSPv), que recebem projeções a partir do AMv, se conectam entre si, estabelecendo uma rede cortical, a qual pode influenciar sítios na amígdala e na formação hipocampal críticos para a formação do traço mnemônico. Demonstramos a partir da expressão de Fos que essas áreas estão seletivamente recrutadas durante a exposição ao predador. No último experimento, as lesões bilaterais de cada uma das áreas corticais aferentadas pelo AMv (PL, ACA, VISam e RSPv) resultaram em perdas expressivas das respostas estereotipadas de medo e de avaliação de risco normalmente observadas durante a exposição ao contexto predatório. Nosso estudo sugere que o AMv participa criticamente da aquisição da memória de medo, alimentando uma rede cortical formada pelas áreas PL, ACA, VISam e RSPv, que demonstramos estar envolvida no processamento mnemônico. Os nossos dados fortalecem a hipótese de módulos corticais como as unidades funcionais do córtex cerebral, indicando a sua participação na aquisição da memória de medo a uma ameaça que represente um risco de morte.

Palavras-chave: Comportamentos de defesa. Medo. Memória. Circuito tálamo-cortical. Córtex cerebral.

ABSTRACT

LIMA, M. A. X. de. **Study of the cortical circuitry underlying contextual fear processing to predatory threat**. 2015. 97 p. Thesis (Ph. D. in Morphofunctional Sciences) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The dorsal premmamillary nucleus (PMd) is the most responsive hypothalamic site to predatory threats and sends massive projections the ventral part of the anteromedial thalamic nucleus (AMv). Neurochemical lesions placed into AMv disrupt contextual, but not innate, fear responses to predatory threats. In the present investigation, we first determined whether the AMv is involved in the acquisition and/or retrieval of the conditioned responses by inactivating the nucleus with muscimol in specific times of the behavioral test. We have also revisited the cortical projections from AMv using the leucoagglutinin of *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), and investigated how these cortical areas are related (using the biotinylated amin dextran; BDA). Next, we determined with Fos expression if the cortical areas targeted by the AMv are recruited during predator exposure, and by using bilateral neurochemical lesions (infusion of N-methyl D-aspartate; NMDA), we investigated if these cortical areas are involved in the fear memory processing. In the first assay, the inactivation of AMv prior to the predator exposure (acquisition window), but not prior to the predator-related context (retrieval window), practically abolished the contextual fear responses and down regulated the expression of Fos in PMd and dorsolateral part of periaqueductal gray, which are recruited during retrieval of fear memory to predator threats. Cortical areas receiving projection from AMv, i.e., prelimbic (PL), anterior cingulate area (ACA), anteromedial visual area (VISam) and the ventral part of retrosplenial area (RSPv), establish a clear cortical network and send projections to amygdalar nuclei and hippocampal formation involved in fear memory processing. We detected that during the predator exposure these set of cortical areas presented a differential Fos expression when compared to adjacent areas, suggesting a selective activation of this cortical network during the acquisition of fear memory. In our last assay, bilateral neurochemical lesions in these different cortical areas target by AMv (i.e, PL, ACA, VISam and RSPv) led to severe impairment of learned, but not innate fear responses, where bilateral lesions in each one of these cortical targets yielded severe fear contextual memory impairment differing significantly from the control group with lesions into the secondary somatomotor area (MOs). By using hodological and functional approaches, our study suggests that AMv is a critical thalamic site for the acquisition of fear memory, and that the integrity of the AMv's cortical field of projection (i.e, PL, ACA, VISam and RSPv) is required for the processing of the mnemonic processes here addressed. Our data corroborate current ideas on functional cortical modules, and help to elucidate how they are involved in the acquisition of fear memories related to life threatening situations.

Keywords: Defensive behavior. Fear. Memory. Thalamo-cortical circuit. Cerebral cortex.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema do aparato experimental.....	30
Figura 2. Fotomicrografia em campo claro de um corte corado pela Técnica de Nissl mostrando o local de implantação das cânulas-guia.....	40
Figura 3. Fotomicrografias em campo claro de cortes submetidos a reação imuno-histoquímica para detecção da proteína Fos no PMD.....	47
Figura 4. Fotomicrografias em campo claro de cortes submetidos a reação imuno-histoquímica para detecção da proteína Fos na PAG.....	48
Figura 5. Representação do sítio de injeção de PHA-L no AMv.....	49
Figura 6. Projeções do AMv no CPF.....	50
Figura 7. Projeções do AMv para regiões corticais posteriores.....	52
Figura 8. Projeções corticais a partir da área cingulada anterior (ACA).....	56
Figura 9. Projeções corticais a partir da área pré-límbica (PL).....	58
Figura 10. Projeções corticais a partir da parte ventral da área retrosplenial (RSPv).....	60
Figura 11. Projeções corticais a partir da área visual anteromedial (VISam).....	61
Figura 12. Esquema das principais projeções corticais das áreas ACA (A), PL (B), RSP (C) e VIS (D).....	63
Figura 13. Neurônios Fos+ nas áreas PL, ILA, ACA e MOs.....	66
Figura 14. Neurônios Fos+ nas áreas VISam, RSPagl, RSPv e RSPv.p.....	67
Figura 15. Cortes corados pela Técnica de Nissl para análise das lesões neuroquímicas feitas através da infusão de NMDA em áreas do córtex cerebral.....	69
Figura 16. Desenho esquemático das conexões do núcleo LA de acordo com Petrovich, Canteras e Swanson (2001)	84
Figura 17. Desenho esquemático das principais conexões de áreas corticais que recebem projeções do AMv a partir de nosso estudo de rastreamento anterógrado.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados do teste comportamental de exposição ao gato dos grupos controles.....	41
Tabela 2. Dados do teste comportamental de exposição ao contexto dos grupos controles.....	42
Tabela 3. Dados do teste comportamental de exposição ao gato dos grupos inativados com muscimol e respectivos controles.....	43
Tabela 4. Dados do teste comportamental de exposição ao contexto dos grupos inativados com muscimol e respectivos controles.....	44
Tabela 5. Densidade de neurônios Fos+ no PMD e PAGdl após a exposição ao contexto predatório (controle).....	46
Tabela 6. Densidade de neurônios Fos+ no PMD e PAGdl após a exposição ao contexto predatório (muscimol).....	46
Tabela 7. Média da densidade de neurônios Fos+ nas áreas corticais de animais controle e expostos ao gato.....	65
Tabela 8. Dados comportamentais dos grupos controle na exposição ao predador e exposição ao contexto predatório.....	70
Tabela 9. Dados comportamentais dos animais com lesões em áreas aferentadas pelo AMv e da área MOs durante a exposição ao predador.....	72
Tabela 10. Dados comportamentais dos animais com lesões em áreas aferentadas pelo AMv e da área MOs durante a exposição ao contexto predatório.....	73
Tabela 11. Comparações das áreas corticais aferentadas pelo AMv com a área controle (MOs)	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico .1. Medidas espaço- temporais e comportamentais durante a exposição ao contexto predatório dos animais que receberam injeção de muscimol ou salina, antes da exposição ao gato ou antes da exposição ao contexto.....	45
Gráfico 2. Densidade de neurônios Fos+ no PMD e PAGdl após a exposição ao contexto predatório de animais que receberam injeção de muscimol ou salina, antes da exposição ao gato ou antes da exposição ao contexto.....	47
Gráfico 3. Análise dos dados comportamentais no momento do contexto, do grupo intacto e do grupo de animais com lesão na área MOs.....	71
Grafico 4. Análise em grupo para cada variável espaço- temporal e comportamental no momento da exposição ao contexto predatório.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3V – terceiro ventrículo

ACA_d - área cingulada anterior, parte dorsal

ACA_v – área cingulada anterior, parte ventral

AD – núcleo anterodorsal do tálamo

AHN – núcleo hipotalâmico anterior

AM_d – núcleo anteromedial do tálamo, parte dorsal

AM_v - núcleo anteromedial do tálamo, parte ventral

ANOVA – análise de variância

AQ – aqueduto cerebral

AV – núcleo anteroventral do tálamo

BDA - amino- dextrano biotinilado

BLA_a – núcleo basolateral da amígdala, parte anterior

BLA_p – núcleo basolateral da amígdala, parte posterior

BMA_p – núcleo basomedial da amígdala, parte posterior

CA1 – área CA1, Corno de Ammon

CEA – núcleo central da amígdala

CM – núcleo central medial do tálamo

CPF_m – córtex pré-frontal, parte medial

DG – giro denteado

EC – estímulo condicionado

ECT – área entorrinal

EI – estímulo incondicionado

ENT_l – área entorrinal, parte lateral

ENT_m – área entorrinal, parte medial

Fos⁺ - neurônios imunorreativos para Fos

fx – fórnice

G1 – grupo 1 do experimento 1

G2 – grupo 2 do experimento 1

G3 – grupo 3 do experimento 1

G4 – grupo 4 do experimento 1

G5 – grupo 5 do experimento 1

IAD – núcleo interanterodorsal do tálamo

IAM – núcleo interanteromedial do tálamo

ILA ou IL – área infra-límbica

LA – núcleo lateral da amígdala

MEA – núcleo medial da amígdala

MOp – área somatomotora primária

MOs – área somatomotora secundária

NMDA - N-metil D-Aspartato

ORBm – área orbital, parte medial

ORBv – área orbital, parte ventral

ORBvl – área orbital, parte ventrolateral

PAGdl – matéria cinzenta periaquedutal, parte dorsolateral

PAGdm – matéria cinzenta periaquedutal, parte dorsomedial

PAGl - matéria cinzenta periaquedutal, parte lateral

PAGvl – matéria cinzenta periaquedutal, parte ventrolateral

PAR – parassubiculum

PERI ou PER – área perirrinal

PHA-L - leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris*

PL – área pré-límbica

PMDdm - núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo, parte dorsomedial

PMDvl - núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo, parte ventrolateral

POR – área pós-rinal

POST – pós-subiculum

PRE - pré-subiculum

PT – núcleo paratenial

PTLp – região parietal, áreas associativas posteriores

PTSD – estresse pós-traumático

PVH – núcleo paraventricular do hipotálamo

PVT – núcleo paraventricular do tálamo

RE – núcleo reuniens

RH – núcleo romboide

RSPagl – área retrosplenial agranular, parte lateral

RSPd - área retrosplenial, parte dorsal

RSPv – área retrosplenial, parte ventral

RSPv,p – área retrosplenial, parte ventral, porção posterior

RT – núcleo reticular do tálamo

sm – estria medular

SOM – região supra-oculomotora

SSp – área somatosensorial primária

SUBd – subiculum, parte dorsal

SUBv – subiculum, parte ventral

TEa – áreas associativas temporais

TTd – *taenia tecta*, parte dorsal

VAL – complexo ventral anterolateral do tálamo

VISam - área visual anteromedial

VISp – área visual primária

VISpm - área visual posteromedial

VMHdm – núcleo ventromedial do hipotálamo, parte dorsomedial

ZI – zona incerta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Breve histórico do estudo das vias neurais do medo a partir do condicionamento clássico.....	21
1.2 A exposição a um predador como modelo experimental para o estudo do estresse pós-traumático: vias neurais do medo inato e contextual.....	22
2 OBJETIVOS.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Animais.....	28
3.2 Experimento 1 – Inativação farmacológica do AMv com muscimol.....	28
3.2.1 <i>Cirurgia estereotáxica para implantação bilateral das cânulas-guia no AMv.....</i>	<i>29</i>
3.2.2 <i>Teste comportamental.....</i>	<i>29</i>
3.2.2.1 <i>Fase 1 – Teste de exposição ao gato.....</i>	<i>30</i>
3.2.2.2 <i>Fase 2 – Teste de exposição ao contexto.....</i>	<i>31</i>
3.2.3 <i>Análise comportamental.....</i>	<i>31</i>
3.2.4 <i>Perfusão e histologia.....</i>	<i>32</i>
3.2.5 <i>Imuno- histoquímica para Fos.....</i>	<i>32</i>
3.2.6 <i>Análise do material histológico e contagem de Fos.....</i>	<i>33</i>
3.2.7 <i>Análise estatística.....</i>	<i>33</i>
3.3 Experimento 2 – Injeção iontoforética do PHA-L no AMv.....	34
3.3.1 <i>Deteção imuno- histoquímica do PHA-L.....</i>	<i>34</i>
3.4 Experimento 3 - Rastreamento anterógrado com BDA de áreas corticais que são aferentadas pelo AMv (ACA, PL, RSPv , VISam).....	35
3.4.1 <i>Deteção histoquímica de BDA.....</i>	<i>35</i>
3.4.2 <i>Análise do material histológico.....</i>	<i>36</i>
3.5 Experimento 4 - Análise da expressão de Fos em áreas corticais de animais controles e de animais submetidos a exposição ao predador.....	37
3.6 Experimento 5 – Lesões neuroquímicas com NMDA das principais áreas corticais aferentadas pelo AMv (ACA, PL, RSP e VISam)	37
4 RESULTADOS.....	39
4.1 Experimento 1 – Inativação farmacológica do AMv com muscimol.....	40
4.1.1 <i>Resultados comportamentais dos grupos controles.....</i>	<i>40</i>
4.1.2 <i>Resultados comportamentais dos grupos inativados com muscimol.....</i>	<i>42</i>

4.1.3 <i>Análise da expressão de Fos no PMD e PAGdl durante a exposição ao contexto</i>	44
4.2 Experimento 2 – Injeção iontoforética do PHA-L no AMv	49
4.3 Experimento 3 - Rastreamento anterógrado com BDA das principais áreas corticais (ACA, PL, RSP e VIS) que são aferentadas pelo AMv	55
4.3.1 <i>Injeção iontoforética de BDA na área cingulada anterior (ACA)</i>	55
4.3.2 <i>Injeção iontoforética de BDA na área pré-límbica (PL)</i>	55
4.3.3 <i>Injeção iontoforética de BDA na parte ventral da área retrosplenial (RSPv)</i>	59
4.3.4 <i>Injeção iontoforética de BDA na área visual anteromedial (VISam)</i>	59
4.4 Experimento 4 - Análise da expressão de Fos em áreas corticais de animais controles e de animais submetidos a exposição ao predador	64
4.4.1 <i>Considerações iniciais e explanação da análise</i>	64
4.4.2 <i>Resultados</i>	64
4.5 Experimento 5 – Lesões neuroquímicas com NMDA das principais áreas corticais aferentadas pelo AMv (ACA, PL, RSP e VISam) e da área MOs	68
4.5.1 <i>Análise Comportamental: considerações iniciais e validação do grupo controle</i>	68
4.5.2 <i>Exposição ao gato</i>	71
4.5.3 <i>Exposição ao contexto predatório</i>	72
5 DISCUSSÃO	76
5.1 O papel do tálamo na memória aversiva	77
5.2 Alvos corticais a partir do AMv	78
5.3 Evidências funcionais do envolvimento de áreas corticais aferentadas pelo AMv no processamento da memória aversiva	80
5.4 Os braços de projeção das áreas corticais aferentadas pelo AMv podem ajudar a explicar seu envolvimento no processamento da memória aversiva	82
5.5 Circuitaria córtico-cortical a partir do AMv: evidências baseadas em dados conectivos	84
6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve histórico do estudo das vias neurais do medo a partir do condicionamento clássico

As espécies animais têm evoluído através de sua sobrevivência em um ambiente repleto de pressões seletivas. Uma das formas de assegurar sua própria existência é a capacidade do animal de se defender de forma inata e aprendida a ameaças predatórias.

Segundo Verburg, Perna e Griez (2001) um método experimental é um procedimento desenhado para falsear uma predição que foi construída por meio de inferências de fenômenos observados na natureza. Dentro dos laboratórios, os neurocientistas têm estudado as vias neurais relacionadas ao aprendizado e memória de medo através do modelo de condicionamento clássico Pavloviano, no qual é explorada a associação entre um estímulo incondicionado (EI; um choque nas patas do rato, por exemplo) com um estímulo condicionado (EC; um som ou um determinado ambiente, por exemplo). O EI leva o rato a expressar respostas de defesa (como o *freezing*, comportamento no qual o animal entra em estado de congelamento motor e apresenta apenas movimentos relacionados com a respiração), enquanto o EC, se apresentado sozinho e sem ser pareado temporalmente com o EI, não surte efeito comportamental parecido. Após algumas sessões de pareamento temporal entre os estímulos (tocar o som e ao final descarregar um choque nas patas), o rato passa a expressar respostas de defesa somente com a apresentação do EC (KATZ; LAMPRECHT, 2014; PHILLIPS; LEDOUX, 1992).

Neste paradigma, núcleos amigdalares como o núcleo lateral (LA) e o complexo basolateral desempenham um papel chave no processo de aprendizado associativo (do EI e EC) e na expressão dos comportamentos de defesa, uma vez que se projetam para o núcleo central da amígdala (CEA), e este para o setor ventrolateral da matéria cinzenta periaquedutal (PAGvl), no tronco encefálico (LEDOUX, 2000). O hipocampo por sua vez, também desempenha um papel crítico tanto no aprendizado quanto na expressão das respostas de defesa contextuais (HUNSAKER; KESNER, 2008). No entanto, muitas áreas corticais como a área cingulada anterior (ACA), retrosplenial (RSP) e área pós-rinal (POR), influenciam as vias de aprendizado dependentes da amígdala e do hipocampo (BISSIÈRE et al., 2008; BURWELL et al., 2004; KEENE; BUCCI, 2008b).

A típica resposta de *freezing* no paradigma de condicionamento clássico depende da integridade do CEA (MAREN, 2001), que, como já mencionado, se projeta para a PAGvl. Esta região no tronco encefálico é crítica para a expressão das respostas de medo

condicionado, incluindo *freezing*, vocalização e analgesia condicionada (VIANNA et al., 2001).

As respostas de defesa acima relatadas são observadas em situações que ameaçam a integridade física ou a vida do animal. Encontros agonísticos como, por exemplo, ficar frente-a-frente com um predador e interações violentas com animais da mesma espécie (MOTTA et al., 2009) também levam a comportamentos de defesa semelhantes aos observados nos estudos de condicionamento clássico do medo. As respostas estereotipadas de defesa (como o *freezing*) observadas em roedores frente a estímulos ameaçadores diferentes, levou por muito tempo a uma visão reducionista dos circuitos neurais que processam esses estímulos (BOLLES, 1970; FANSELOW, 1994), sempre no entorno do núcleo CEA e suas áreas de conexões. No entanto, considerando a hipótese alternativa de que circuitos neurais diferentes podem ser mobilizados de acordo com o tipo de estímulo apresentado (e não de que comportamentos semelhantes são desencadeados sempre pelas mesmas áreas do cérebro), novos dados começaram pouco a pouco surgir nesse cenário e serão apresentados na sequência (GROSS; CANTERAS, 2012; MOTTA et al., 2009; SILVA et al., 2013).

1.2 A exposição a um predador como modelo experimental para o estudo do estresse pós-traumático: vias neurais do medo inato e contextual

A exposição ao predador representa um evento perigoso e extremamente ameaçador para a vida do animal, e induz respostas defensivas inatas (que são assim definidas por serem respostas comportamentais expressas frente a uma situação de perigo na qual o animal não tenha experienciado previamente, como por exemplo, o caso de um rato de laboratório frente a um gato). Essa exposição produz efeitos residuais e funciona como um bom modelo para reproduzir determinados aspectos do estresse pós-traumático (PTSD, do inglês, *post-traumatic stress disorder*) observado em humanos. Em sua recente revisão de literatura sobre a validação dos modelos animais de PTSD, Goswami et al. (2013) descrevem que pacientes com PTSD exibem memórias traumáticas persistentes (pesadelos, pensamentos intrusivos), hipervigilância, hiperexcitação, medo desregulado (generalização e extinção deficiente) assim como disfunção hipocampal. A exposição ao predador parece reproduzir a hiperexcitação e ansiedade crônica, gera déficits de processamento hipocampal e minimiza a extinção de medo, ou seja, simula em animais um quadro de PTSD em humanos. Além disso, a exposição ao predador também parece induzir mudanças compatíveis com uma hiperatividade amigdalal observada em pacientes de PTSD, como aumento na expressão de sinaptofisina na amígdala

(CAMPOS et al., 2013) e potenciação de longo prazo da transmissão neural excitatória na amígdala basolateral (ADAMEC et al., 2012).

A exposição de um rato ao odor ou a presença real de um gato evoca intensas respostas defensivas, tais como o *freezing* e o *flight* (fuga), e elementos comportamentais de avaliação de risco (BLANCHARD; BLANCHARD; HORI, 1989; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005). Ainda, a reexposição do rato em um local em que ele encontrou previamente um predador evoca intensas respostas comportamentais estereotipadas de avaliação de risco como o *crouch sniff* e *stretch attend*, e reduz drasticamente comportamentos exploratórios como o *locomotion* e *up right position* (CARVALHO-NETTO et al., 2010; CEZARIO et al., 2008; MARTINEZ et al., 2011; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005).

A presença do gato mobiliza sítios distintos da amígdala e hipotálamo (para revisão, ver GROSS; CANTERAS, 2012). Na amígdala, duas vias informam ao rato a presença de perigo: o núcleo medial (MEA) e a parte posterior do núcleo basomedial (BMAp). O primeiro está relacionado ao odor do predador, uma vez que recebe informações diretamente do bulbo olfatório acessório (CANTERAS, 2002; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001), enquanto o segundo está relacionado com a detecção do predador por meio de áreas associativas visuais e auditivas (além de receber também informação do MEA, e portanto é um provável integrador das pistas relacionadas do predador; CANTERAS, 2002). Além dos dados anatômicos, dados funcionais mostram que lesões citotóxicas no MEA, mas não no CEA (como no caso do condicionamento clássico de choque nas patas), provocam uma redução significativa nas respostas de defesa inatas frente a um gato ou ao seu odor (LI; MAGLIAO; TAKAHASHI, 2004; MARTINEZ et al., 2011).

Tanto o MEA quanto o BMAp projetam-se para a parte dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo (VMHdm; CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; PETROVICH; RISOLD; SWANSON, 1996). Esse núcleo, juntamente com o núcleo hipotalâmico anterior (AHN) e o núcleo pré-mamilar dorsal (PMD), compõem o circuito hipotalâmico defensivo medial (CANTERAS, 2002; MARTINEZ et al., 2008). Esses três núcleos apresentam um aumento significativo na expressão da proteína Fos (marcador de ativação neuronal) quando o rato é exposto a um predador ou a um contexto predatório (local em que encontrou o predador; CANTERAS et al., 1997; CEZARIO et al., 2008).

Como mencionado logo acima, o VMHdm é a porta de entrada das informações relacionadas ao predador para o circuito hipotalâmico defensivo medial. Neste circuito, o PMD é o sítio hipotalâmico mais responsivo a ameaça predatória real e contextual

(CANTERAS et al., 1997; CEZARIO et al., 2008). De fato, lesões centradas no PMD reduzem significativamente as respostas defensivas, seja a um predador ou ao seu odor (BLANCHARD et al., 2003; CANTERAS et al., 1997; CEZARIO et al., 2008). Adicionalmente, foi mostrado que as respostas de defesa relacionadas ao contexto aversivo (lugar previamente associado ao predador) são abolidas após a inativação farmacológica do PMD (CANTERAS et al., 2008; CEZARIO et al., 2008; DO MONTE et al., 2008).

Dados anatômicos e funcionais têm mostrado que estruturas que são alvos de projeção do PMD, descendentes ou ascendentes, podem influenciar aspectos específicos do processamento inato ou cognitivo das respostas de defesa. A parte dorsolateral da matéria cinzenta periaquedutal (PAGdl), por exemplo, recebe projeções do PMD (CANTERAS; SWANSON, 1992) e desempenha um papel fundamental na expressão das respostas de defesa inatas, bem como nas respostas de defesa condicionadas (ambiente associado a uma ameaça predatória; CEZARIO et al., 2008). Recentemente, Carvalho-Netto et al. (2010) demonstraram que a parte ventral do núcleo anteromedial do tálamo (AMv), um dos principais alvos de projeção do PMD (CANTERAS; SWANSON, 1992), está envolvido de forma crítica no processamento de memória emocional relacionada ao contexto predatório (lugar previamente associado ao gato), mas não ao medo incondicionado (exposição ao gato). Resumidamente, os autores constataram que lesões combinadas no AMv e no núcleo reuniens (RE), outro sítio de projeção do PMD, foram capazes de reduzir respostas defensivas relacionadas ao medo contextual. Resultados significativos também foram obtidos com lesão individual unilateral do AMv, mas não com lesão individual no RE.

A literatura mostra que o AM envia projeções para diversas regiões corticais, tais como áreas do córtex pré-frontal medial (CPFm), área retrosplenial (RSP), entorrinal (ENT), perirrinal (PERI), assim como para o subiculum ventral (SUBv) e pré-subiculum (PRE; RISOLD; SWANSON, 1995; SHIBATA, 1993a, b; VAN GROEN; KADISH; WYSS, 1999). Dados indicam que lesões eletrolíticas ou neurotóxicas na área RSP comprometem o processamento do medo contextual relacionado ao choque nas patas (condicionamento clássico; KEENE; BUCCI, 2008a, b). Muitos estudos mostram ensaios funcionais relacionados ao condicionamento clássico em várias áreas corticais (que serão discutidos posteriormente). No entanto, como já explicitado, há circuitos neurais distintos (principalmente na amígdala, hipotálamo e matéria cinzenta periaquedutal) que são mobilizados mediante diferentes situações de perigo (GROSS; CANTERAS, 2012; MOTTA et al., 2009), e quase nada ou nenhum dado relacionado ao paradigma do medo predatório em áreas do córtex cerebral consta na literatura.

2 OBJETIVOS

Uma vez que já se sabe que o AMv está envolvido em alguma instância do processamento da memória aversiva predatória (CARVALHO-NETTO et al., 2010) e também relacionada ao contexto do condicionamento clássico (choque nas patas; MARCHAND et al., 2013), nosso intuito foi inicialmente dissecar o papel do AMv durante o processamento da memória aversiva (exposição ao contexto predatório), para saber se ele está envolvido na aquisição ou expressão das respostas de defesa contextuais (Experimento 1). Neste experimento o AMv foi inativado com um agonista GABAérgico (muscimol) em tempos diferentes do teste comportamental (antes da exposição ao gato em um grupo, e antes da exposição ao contexto em outro). Na sequência, realizamos um estudo de rastreamento neural anterógrado utilizando a leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) a partir do AMv para detectarmos seus principais alvos de projeção corticais (Experimento 2; muitos estudos na literatura como já mencionados acima visaram rastrear as projeções do AM como um todo, não necessariamente só de sua parte ventral).

Uma vez mapeadas as áreas corticais que recebem projeções do AMv (a saber: área cingulada anterior, ACA; pré-límbica, PL; parte ventral da área retrosplenial, RSPv e área visual anteromedial, VISam), realizamos novos experimentos de rastreamento anterógrado em cada uma dessas áreas utilizando o amino-dextrano biotinilado (BDA) para mapearmos suas eferências (Experimento 3) e possivelmente verificar a presença de uma rede cortical estabelecida entre essas áreas. Na sequência, levantamos a hipótese de que essas áreas corticais (ACA, PL, VISam e RSPv) poderiam estar seletivamente mais ativadas do que outros sítios corticais no momento de exposição ao predador, e então fizemos uma análise da expressão da proteína Fos para testar esta hipótese (Experimento 4). Finalmente, fizemos lesões neuroquímicas nas áreas ACA, PL, VISam, RSP e na área somatomotora secundária (MOs; controle de área) através da infusão de N-metil D-Aspartato (NMDA) e submetemos os grupos de animais aos testes comportamentais para verificar possíveis déficits no processamento da memória aversiva (Experimento 5).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Em todos os experimentos foram utilizados ratos *Wistar*, provenientes do Departamento de Anatomia do ICB-USP, com 3 meses de idade (por volta de 300 g), mantidos em condições estáveis de temperatura (aproximadamente 23 °C) e ciclo claro/escuro controlados (12 horas), com livre acesso a água e ração. Todos os animais foram mantidos no biotério de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foram tomadas todas as medidas necessárias para utilizar o menor número possível de animais e evitar seu sofrimento. O gato utilizado para os experimentos comportamentais é mantido pelo gatil da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Assim, a cada experimento de exposição ao predador, solicitamos a utilização de um animal, o qual foi transportado adequadamente e mantido no aparato comportamental sem sofrer manipulação experimental alguma.

3.2 Experimento 1 – Inativação farmacológica do AMv com muscimol

A nomenclatura de áreas cerebrais adotada nesse trabalho está baseada no atlas “*Brain maps: structure of the rat brain*” (SWANSON, 2004).

Neste experimento, nosso intuito foi verificar se o AMv está envolvido na aquisição ou na expressão da memória aversiva frente a um estímulo predatório. Para tal, realizamos estudos comportamentais e análise de expressão de Fos em cinco grupos experimentais:

- Grupo 1 – Branco (animais não manipulados cirurgicamente; n= 7);
- Grupo 2 – Injeção de muscimol no AMv antes da exposição ao gato (n= 9);
- Grupo 3 – Injeção de solução salina 0,9% no AMv antes da exposição ao gato (controle do grupo 2; n= 9);
- Grupo 4 – Injeção de muscimol no AMv antes da exposição ao contexto predatório (n= 9);
- Grupo 5 - Injeção de solução salina 0,9% no AMv antes da exposição ao contexto predatório (controle do grupo 4; n= 9).

Descreverei inicialmente a cirurgia estereotáxica para implantação bilateral das cânulas-guia no AMv (para realização dos Grupos 2, 3, 4 e 5). Em seguida, descreverei o teste e a análise comportamental, seguido pela descrição da imuno-histoquímica para detecção da proteína Fos.

3.2.1 Cirurgia estereotáxica para implantação bilateral das cânulas-guia no AMv

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (Vetaset, Laboratório Fort Dodge, Campinas, SP) e xilazina (Rompum, Bayer, São Paulo, SP; 1:2 v/v; 1 ml/ kg de peso) e colocados no estereotáxico. Devido a proximidade do AMv com o plano mediano, as cânulas-guia de aço (cat# C313GS-5; Plastics One Inc. Roanoke, VA, USA) tiveram de ser implantadas com 10 ° de angulação em relação ao plano mediano, e garantimos assim espaço suficiente para a acomodação das duas cânulas. As cânulas foram implantadas com a ponta localizada 0,7 mm acima do AMv, a fim de não causar lesão física no núcleo (coordenadas estereotáxicas: anteroposterior, 7,4 mm do polo frontal; mediolateral, 1,9 mm do meio do seio sagital; dorsoventral, 5,6 mm da superfície do encéfalo). As cânulas foram fixadas com resina acrílica e ancoradas através de parafusos de aço no crânio. Os animais tiveram um pós-operatório de 10 dias antes do teste comportamental. Trinta minutos antes do teste de exposição ao gato ou de exposição ao contexto predatório (descrição a seguir), os animais receberam uma única dose de muscimol (ou solução salina 0,9%) em cada AMv (0,3 µl; Tocris, Ellisville, MO, USA) na concentração de 0,6 µg/ µl. Para a administração de muscimol ou salina, os animais foram segurados cuidadosamente e uma cânula injetora removível (cat # C313IS-5, Plastics One Inc.) foi inserida dentro de cada cânula guia, se estendendo 0,6 mm além da ponta da cânula. A bomba injetora foi ligada a duas seringas Hamilton 1 µL ligada, por sua vez, a uma bomba injetora (modelo 11; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). As cânulas injetoras ficaram conectadas nas cânulas-guia por mais 3 minutos depois da infusão.

3.2.2 Teste comportamental

Os animais foram individualizados em uma caixa moradia (25x25x25 cm) com porta, ligada a um corredor com um metro de extensão para acesso a uma segunda caixa (compartimento de comida), com as mesmas dimensões da caixa moradia. Todo o aparato experimental é construído em acrílico e está representado na figura abaixo:

Figura 1. Esquema do aparato experimental.

Cada animal permaneceu na caixa moradia durante todo o período de claro, onde teve água e comida a vontade e foi manipulado diariamente sempre pelo mesmo experimentador. Durante 10 dias, 3 horas antes do início do ciclo escuro, a ração foi removida da caixa moradia e posicionada no compartimento de comida. Na primeira hora do ciclo escuro, quando ocorre o período de maior atividade e o primeiro pico alimentar do rato, a porta da caixa moradia foi aberta, permitindo que os animais explorassem o corredor e se deslocassem até o compartimento de comida, para obterem a ração ali depositada.

Os testes comportamentais consistiram em duas fases, nas quais houve um período de observação de 10 minutos (600 segundos) durante o início da fase escura do ciclo claro/escuro. Durante os testes de exposição ao gato e exposição ao contexto predatório, os animais foram filmados usando uma câmera de vídeo montada horizontalmente, com iluminação de luz vermelha de 50 W.

3.2.2.1 Fase 1 – Teste de exposição ao gato

No 11º dia, assim que a porta da caixa moradia foi aberta, um gato adulto macho foi colocado e mantido no compartimento de comida por um experimentador. Nessa fase observamos por 10 minutos o comportamento do rato diante do gato. Quando completaram os 10 minutos, o gato foi removido e o compartimento de comida e o corredor foram limpos com álcool 5% e secos com papéis-toalha.

3.2.2.2 Fase 2 – Teste de exposição ao contexto

No dia seguinte após a exposição ao gato, observamos por 10 minutos o comportamento do rato no ambiente onde o predador foi encontrado previamente (contexto predatório). Note que os animais estavam na caixa moradia e foram expostos ao contexto predatório somente depois de aberta a porta que dá acesso ao corredor e ao compartimento de comida, lugar em que o predador foi anteriormente encontrado. Assim como nas outras fases, não foi oferecida ração durante o período de teste.

3.2.3 Análise comportamental

Cada animal foi analisado nas Fases 1 e 2 do teste comportamental. Assim, os animais foram filmados e os dados analisados posteriormente por um observador treinado utilizando o *software* de análise etológica *The Observer* (Noldus). A análise envolveu mensuração espaço-temporal e comportamental. A mensuração espaço-temporal está relacionada ao tempo (em segundos) que o animal gasta na caixa moradia, corredor ou compartimento de comida. Os dados comportamentais foram processados em termos de duração (duração total por sessão). As seguintes respostas comportamentais foram categorizadas: “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 esquadrinhar o ambiente; “Stretch Attend Posture” → o animal estende a cabeça e parte do corpo para frente, mantém a cauda elevada, porém não se desloca; “Stretch Approach” → o animal mantém a mesma postura anterior, mas desloca-se para frente; “Up right position” → o animal fica em pé, com as patas traseiras e dianteiras estendidas e apoiadas nas paredes do aparato; “Locomotion” → animal se locomove mais de 1cm sem estar com o corpo estendido; “Rearing” → 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; e “Outras respostas” → como, por exemplo, *grooming*, comer, beber, etc.

3.2.4 Perfusão e histologia

Ao fim do teste comportamental de contexto, os animais foram perfundidos após 90 minutos para análise da expressão da proteína Fos (descrita a seguir) nos sítios neurais, mediante técnica imuno-histoquímica. Assim, os animais foram anestesiados com sódio pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) para a perfusão transcardíaca com uma solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M com pH de 7,4, precedida por solução salina 0,9%. Após a perfusão, os encéfalos foram retirados do crânio e colocados em solução de sacarose 20% feita em tampão fosfato 0,1M na temperatura de 4 °C por um período de aproximadamente 12 horas. Posteriormente, os encéfalos foram congelados e cortados no plano frontal em micrótomo de congelação, com espessura de corte de 40 µm. Os cortes foram recolhidos em 4 séries. Uma série foi montada previamente em lâminas gelatinizadas e coradas pela Técnica de Nissl, para referência citoarquitetônica. Outra série foi utilizada para reação imuno-histoquímica para detecção da proteína Fos. Os procedimentos de perfusão e histologia aqui descritos aplicam-se a todos os outros experimentos descritos na sequência.

3.2.5 Imuno-histoquímica para Fos

Os cortes foram incubados em anticorpo anti-Fos de coelho (Ab-5, Calbiochem, San Diego, CA, USA) utilizando a diluição de 1:40.000. O anticorpo primário foi localizado com uma variação do complexo avidina-biotina. Os cortes foram incubados por 90 minutos em temperatura ambiente numa solução de *goat anti-rabbit* IgG biotinizada (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), e então colocados numa solução mista de avidina-biotina *horseradish peroxidase* (ABC Elite; Vector Laboratories) pelo mesmo período de tempo. O complexo peroxidase foi visualizado pela exposição por cerca de 10 minutos numa solução cromógena contendo 0,02% de 3,30 diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB, Sigma, St Louis, MO, USA) com 0,3% de sulfato de níquel-amônia em tampão Tris a 0,05 M (pH 7,6), seguido de incubação por 10 minutos em solução cromógena com hidrogênio peroxidase (1:3000) para resultar num produto azul escuro. A reação foi interrompida por lavagens em tampão salina Potássio Fosfato (KPBS; pH 7,4). Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e posteriormente desidratados e cobertos com DPX (Sigma). Uma série de cortes adjacentes foi corada com tionina pelo método de Nissl para servir como referência citoarquitetônica.

3.2.6 Análise do material histológico e contagem de Fos

A observação do local de implantação das cânulas bem como a análise de expressão da proteína Fos foram feitas através de um microscópio Nikon E600. Para a análise de Fos, utilizamos o *software Image Pro-Plus* e estimamos o número de células Fos-positivas (Fos+) por mm² de tecido (densidade).

3.2.7 Análise estatística

Para os dados dos grupos controles (Grupos 1, 3 e 5), os resultados foram analisados através de uma *one-way* ANOVA (análise de variância). Devido ao número de variáveis dependentes (oito), o nível de significância empregado na ANOVA foi ajustado para baixo através da correção de Bonferroni ($\alpha=0.006$).

Na análise dos grupos experimentais e seus respectivos controles (Grupos 2, 3, 4 e 5), usamos uma *two-way* ANOVA (análise de variância) univariada (design fatorial 2x2), e devido ao número de variáveis dependentes, o nível de significância empregado na ANOVA foi ajustado para baixo (Correção de Bonferroni; $\alpha=0.006$). Dessa forma, o teste nos mostraria se haveria efeito significativo para o efeito principal (*main effect*; droga ou exposição) ou interação de ambos (droga x exposição).

O esquema de análise aqui descrito foi empregado tanto para os dados comportamentais, quanto para os dados colhidos a partir das contagens de Fos.

Nos experimentos de rastreamento anterógrado descritos a seguir, realizamos a injeção da leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) no AMv e do amino-dextrano biotinilado (do inglês, *biotinylated dextran amine*; BDA) nas áreas corticais pré-lobina (PL), área cingulada anterior (ACA), parte ventral do córtex retrosplenial (RSPv) e área visual anteromedial (VISam).

3.3 Experimento 2 – Injeção iontoforética do PHA-L no AMv

Os animais (n= 6) 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 do PHA-L a 2,5% no AMv (coordenadas estereotáxicas: 7,2 mm do polo frontal; mediolateral, 0,8 mm do meio do seio sagital; dorsoventral, 6,3 mm da superfície do encéfalo). Os depósitos foram feitos através de micropipetas de vidro com diâmetro interno de ponta da ordem de 15 µm, mediante aplicação de +5 µA de corrente pulsátil (7 s *on*, 7 s *off*) durante 15 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. Após a sutura, os animais foram mantidos vivos por 15 dias e perfundidos na sequência.

3.3.1 Detecção imuno-histoquímica do PHA-L

Os cortes foram incubados durante 48 horas em uma solução de KPBS 0,02M contendo Triton X-100 0,3% e soro normal de cabra 2%, usando-se um anticorpo primário anti-PHA-L obtido em coelho (Dako Laboratories) numa diluição de 1:5000. Para localização do complexo antígeno-anticorpo os cortes foram incubados por 2 horas no anticorpo secundário biotinilado feito em cabra (*biotinylated anti-Rabbit IgG*, Vector Laboratories) 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) numa diluição 1:200, KPBS 0,02 M e Triton X-100 0,3%; para ligar a peroxidase ao complexo antígeno-anticorpo. Para a revelação do complexo antígeno-anticorpo, na reação de imunoperoxidase, os cortes foram incubados em uma solução de 100 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo 50 mg de tetrahidrocloreto de 3-3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma),

0,6 mg de glicose oxidase e 40 mg de cloreto de amônia, por 5 minutos. Em seguida, foi adicionada a β -D-glicose (100 mg/50 ml de solução; Sigma), e a reação foi interrompida após um período de aproximadamente 15 minutos.

Após a reação imuno-histoquímica, os cortes foram montados em lâminas recobertas com gelatina e tratados posteriormente com tetróxido de ósmio para se obter um aumento da visualização do produto da reação. Em seguida, os cortes foram desidratados e cobertos com DPX (Aldrich Chemical Co.). Cortes adjacentes foram corados pelo método de Nissl, com tionina 0,25% como corante, para servir como referência citoarquitetônica.

3.4 Experimento 3 - Rastreamento anterógrado com BDA de áreas corticais que são aferentadas pelo AMv (ACA, PL, RSPv, VISam)

Os animais (n= 16; 4 animais por cada grupo de área) foram anestesiados por via intraperitoneal com uma solução de equitesin (0,3 ml/ 100 g) e em seguida posicionados em aparelho estereotático, onde receberam um depósito iontoforético unilateral de BDA em regiões específicas do córtex cerebral (coordenadas estereotáticas: ACA: 2,5 mm do pólo frontal; mediolateral, 0,5 mm do meio do seio sagital; dorsoventral, 0,9 mm da superfície do encéfalo. PL: 1,9 mm do polo frontal; mediolateral, 0,5 mm do meio do seio sagital; dorsoventral, 2,0 mm da superfície do encéfalo. RSPv: 9,8 mm do polo frontal; mediolateral, 0,5 mm do meio do seio sagital; dorsoventral, 1,8 mm da superfície do encéfalo. VISam: 9,8 mm do polo frontal; mediolateral, 1,7 mm do meio do seio sagital; dorsoventral, 0,5 mm da superfície do encéfalo). Os depósitos foram feitos através de micropipetas de vidro com diâmetro interno de ponta da ordem de 25 μ m, mediante aplicação de +8 μ A de corrente pulsátil (7 s *on*, 7 s *off*) durante 15 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. Após a sutura, os animais foram mantidos vivos por 10 dias e perfundidos na sequência.

3.4.1 Detecção histoquímica de BDA

Para detecção do BDA, os cortes foram incubados durante 90 minutos no complexo de avidina-biotina (ABC Elite Kit, Vector Laboratories) numa diluição 1:200, KPBS 0,02 M e Triton X-100 0,3%. Ao final, os cortes foram lavados durante 15 minutos em KPBS 0,05 M.

Para visualização do produto da reação, os cortes foram incubados em uma solução de 100 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo 50 mg de tetrahidrocloreto de 3-3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma), 0,6 mg de glicose oxidase e 40 mg de cloreto de amônia, por 5 minutos. Em seguida, foi adicionada 50 mg β -D-glicose (Sigma), e a reação foi interrompida após um período de aproximadamente 15 minutos. Após a reação histoquímica, os cortes foram montados em lâminas recobertas com gelatina. Em seguida, os cortes foram desidratados e recobertos com DPX (Aldrich Chemical Co.). Cortes adjacentes foram corados pelo método de Nissl, com tionina 0,25% como corante, para servir como referência citoarquitetônica.

3.4.2 Análise do material histológico

O local de injeção do traçador foi plotado com auxílio de uma câmera lúcida acoplada a um microscópio Nikon E600, a partir de desenhos de cortes adjacentes corados com a técnica de Nissl. Para visualização das fibras anterogradamente marcadas, fizemos fotomicrografias em campo escuro, que foram tratadas posteriormente com *software* de edição de imagens (*Adobe Photoshop* e *CorelDRAW*).

3.5 Experimento 4 - Análise da expressão de Fos em áreas corticais de animais controles e de animais submetidos a exposição ao predador

Neste experimento expomos um grupo de animais ao predador (n= 5) e os perfundimos após 90 minutos. Outro grupo de animais foi simplesmente anestesiados em condições estáveis de biotério e perfundidos na sequência (grupo controle; n= 5). O procedimento de imuno-histoquímica para Fos e o método de contagem foi anteriormente descrito. Aqui, comparamos o padrão de ativação de áreas corticais aferentadas pelo AMv (ACA, PL, VISam e RSPv) com o de áreas corticais adjacentes (área somatomotora secundária, MOs; infra-límbica, ILA; parte lateral da área retrosplenial agranular, RSPagl; porção posterior da área RSPv, RSPv,p) tanto no grupo de animais controle (sem manipulação comportamental) quanto no grupo de animais expostos ao predador. Para a análise estatística, empregamos quatro ANOVAS univariadas para comparar a densidade de neurônios Fos+ de uma área cortical aferentada pelo AMv com a de sua área cortical adjacente, tanto nos animais do grupo controle, quanto nos animais expostos ao predador. Devido ao número de variáveis, aplicamos a correção de Bonferroni e o α foi corrigido para 0,01. Após o emprego da ANOVA, aplicamos o pós-teste de Tukey para saber se havia diferença significativa entre a ativação das áreas corticais nos animais do grupo controle, e nos animais do grupo exposto ao gato.

3.6 Experimento 5 – Lesões neuroquímicas com NMDA das principais áreas corticais aferentadas pelo AMv (ACA, PL, RSP e VISam)

Neste experimento, além do grupo não operado (intacto; n= 6), os animais foram divididos em cinco grupos: Grupo 1: lesão bilateral na área MOs (n= 8); Grupo 2: lesão bilateral na ACA (n= 10); Grupo 3: lesão bilateral na área PL (n= 9); Grupo 4: lesão bilateral na área RSP (n= 9); Grupo 5: lesão bilateral na área VISam (n= 9). Para a cirurgia, 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 injeção bilateral (em uma das áreas selecionadas) de NMDA (agonista glutamatérgico; Sigma, St. Louis, MO, USA) por infusão com uma seringa Hamilton. Em cada área foi injetada a quantidade de 300 nl de NMDA no intervalo de 3 minutos. Após a injeção, a agulha de injeção foi mantida no local por mais 3 minutos para evitar o escoamento do NMDA para outras áreas. As coordenadas estereotáxicas das cirurgias para cada área são as mesmas já descritas no experimento de injeção dos traçadores (com exceção da área MOs. Coordenadas estereotáxica: 7,3 mm do

polo frontal; 1,2 mm do seio sagital; 1,2 mm da superfície do encéfalo). Após as lesões os animais permaneceram em repouso por pelo menos 5 dias antes do início do teste comportamental. O teste comportamental e os procedimentos histológicos foram descritos anteriormente no Experimento 1. Na análise comportamental deste experimento, por se tratarem de padrões comportamentais exploratórios, os comportamentos de *locomotion* e *up right position* foram agrupados na categoria “Exploração”, e os comportamentos de *stretch attend* e *crouch sniff* (relacionados a investigação cautelosa do ambiente), foram agrupados na categoria “Avaliação de Risco”.

Na análise estatística, primeiramente testamos se havia diferença nos dados comportamentais entre os grupos não operado e com lesão na área MOs, tanto no momento da exposição ao gato, quanto no momento da exposição ao contexto predatório. Por ser uma análise de dois grupos, aplicamos o teste não paramétrico U de Mann-Whitney. Após, realizamos uma análise de grupo (MOs vs. ACA vs. PL vs. VISam vs. RSP) para cada variável espaço-temporal e comportamental através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Devido ao número de variáveis, na exposição ao gato o α foi corrigido para 0,01, e na exposição ao contexto o α foi ajustado para 0,008. Após a análise em grupo, comparamos em pares cada grupo experimental de lesão em áreas corticais aferentadas pelo AMv com o grupo de lesão na área MOs. Aqui, utilizamos o teste não paramétrico U de Mann-Whitney com a correção de Bonferroni ($\alpha = 0,125$).

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1 – Inativação farmacológica do AMv com muscimol

Neste experimento, somente os animais com correto posicionamento da cânula foram utilizados na análise (Grupo 2 (G2; muscimol injetado antes da exposição ao gato), $n= 6$), Grupo 3 (G3; salina injetada antes da exposição ao gato), $n= 6$), Grupo 4 (G4; muscimol injetado antes da exposição ao contexto), $n= 7$), Grupo 5 (G5; salina injetada antes da exposição ao contexto), $n= 6$). A Figura 2 ilustra o posicionamento das cânulas-guia acima do AMv.

Figura 2 – Fotomicrografia em campo claro de um corte corado pela Técnica de Nissl mostrando o local de implantação das cânulas-guia. Notar que as cânulas ficaram localizadas imediatamente acima do núcleo, sem causar dano físico no AMv. Abreviaturas: 3v, terceiro ventrículo; AMd, núcleo anteromedial do tálamo, parte dorsal; AMv, núcleo anteromedial do tálamo, parte ventral; fx, fórnice; IAM, núcleo interanteromedial do tálamo; PVH, núcleo paraventricular do hipotálamo; PVT, núcleo paraventricular do tálamo; RE, núcleo reuniens; RT, núcleo reticular do tálamo.

4.1.1 Resultados comportamentais dos grupos controles

Primeiro, nós examinamos se o dano físico causado pelas cânulas a algumas estruturas encefálicas causaria algum impacto na resposta de medo inato e contextual. Para responder a esta pergunta, usamos uma *one-way* ANOVA para comparar os animais não operados (G1)

com os animais dos grupos G3 e G5 (com implantes de cânulas e injeção de salina antes da exposição ao gato, e antes da exposição ao contexto, respectivamente). Assim como exibido na Tabela 1, durante a exposição ao gato, o teste estatístico não mostrou diferenças entre os grupos nas avaliações espaço – temporal ($F_{(2, 16)} < 0,31$; $p = 0,73$) nem comportamental ($F_{(2, 16)} < 2,04$; $p > 0,16$).

Tabela 1. Dados do teste comportamental de exposição ao gato dos grupos controles.

	Grupos			Estatística F _(2, 16) ; p
	G1 (n= 7) (não operado)	G3 (n= 6) (Salina antes do gato)	G5 (n= 6) (Salina antes do contexto)	
Medidas espaço-temporais				
Caixa Moradia	569,5 ± 7,65	577,0 ± 9,87	577,3 ± 6,53	0,31; 0,73
Corredor	30,47 ± 7,65	22,96 ± 9,87	22,71 ± 6,53	0,30; 0,73
Caixa de Comida	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0; 0,0
Itens comportamentais				
Exploração	49,85 ± 1,75	79,49 ± 17,77	64,79 ± 7,10	2,04; 0,16
Crouch sniff	80,41 ± 17,35	101,9 ± 9,70	75,09 ± 25,87	0,54; 0,58
Stretch attend	23,17 ± 5,58	26,31 ± 8,33	21,67 ± 1,68	0,15; 0,85
Stretch approach	2,14 ± 2,14	4,35 ± 2,21	2,47 ± 1,61	0,34; 0,71
Freezing	440,6 ± 17,49	383,1 ± 30,46	434,6 ± 31,15	1,42; 0,27

Os valores estão expressos em média ± erro padrão do tempo em segundos, durante um período de observação de 10 minutos.

Durante a exposição ao contexto predatório (detalhes na Tabela 2), a ANOVA também não mostrou diferenças entre os grupos no aspecto comportamental ($F_{(2, 16)} < 1,68$; $p > 0,21$). No entanto, os animais com cânulas dos grupos G3 e G5 (com injeções de salina antes da exposição ao gato ou antes da exposição ao contexto), ficaram poucos segundos do teste no corredor (ver Tabela 2). Neste caso, após aplicar a correção de Bonferroni ($\alpha = 0,006$), a mensuração espaço-temporal não diferiu significativamente também entre os grupos.

Tabela 2. Dados do teste comportamental de exposição ao contexto dos grupos controles.

	Grupos			Estatística
	G1 (n= 7) (não operado)	G3 (n= 6) (Salina antes do gato)	G5 (n= 6) (Salina antes do contexto)	$F_{(2, 16)}$; p
Medidas espaço-temporais				
Caixa moradia	600,0 $\pm$ 0,0	578,1 $\pm$ 5,59	589,8 $\pm$ 5,91	6,23; 0,009
Corredor	0,0 $\pm$ 0,0	21,50 $\pm$ 5,54	10,19 $\pm$ 5,91	6,05; 0,01
Caixa de comida	0,0 $\pm$ 0,0	0,40 $\pm$ 0,40	0,0 $\pm$ 0,0	1,09; 0,35
Itens comportamentais				
Exploração	120,2 $\pm$ 9,63	159,2 $\pm$ 24,72	140,2 $\pm$ 6,31	1,68; 0,21
Crouch sniff	331,1 $\pm$ 13,20	298,2 $\pm$ 23,63	295,1 $\pm$ 13,66	1,42; 0,26
Stretch attend	85,92 $\pm$ 4,12	79,62 $\pm$ 6,01	94,32 $\pm$ 6,79	1,63; 0,22
Stretch approach	6,66 $\pm$ 5,22	11,74 $\pm$ 6,556	15,27 $\pm$ 1,93	0,76; 0,48
Freezing	52,39 $\pm$ 9,61	34,85 $\pm$ 4,88	52,44 $\pm$ 13,16	1,03; 0,37

Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão do tempo em segundos, durante um período de observação de 10 minutos.

4.1.2 Resultados comportamentais dos grupos inativados com muscimol

De acordo com o fato de que os animais com cânulas e que receberam salina (G3 e G5) não foram estatisticamente diferentes do grupo não operado (G1), eles foram usados como controles e comparados aos grupos de animais que receberam a injeção de muscimol (antes da exposição ao gato (G2) ou antes da exposição ao contexto (G4)). A comparação entre os grupos que receberam injeção de salina ou muscimol antes da exposição ao gato ou antes da exposição ao contexto foi feita num design fatorial 2 x 2, usando uma *two-way* ANOVA univariada (devido ao número de variáveis dependentes, o nível de significância empregado na ANOVA foi ajustado para baixo; Correção de Bonferroni; $\alpha=0,006$).

Durante a exposição ao gato, a ANOVA não mostrou diferenças significativas para nenhum dos efeitos principais (*main effects*): nem para tipo de droga (salina x muscimol; $F_{(1,21)} < 0,76$; $p > 0,39$), nem para o tempo da injeção (antes da exposição ao gato x antes da exposição ao contexto; $F_{(1, 21)} < 2,51$; $p > 0,12$), e sem diferenças significativas para a interação entre o tempo da injeção e o tipo da droga injetada (ver Tabela 3).

Tabela 3. Dados do teste comportamental de exposição ao gato dos grupos inativados com muscimol e respectivos controles.

	Grupos				Interação F _(1, 21) ; p
	G2 (n= 6) (Muscimol antes do gato)	G3 (n= 6) (Salina antes do gato)	G4 (n= 7) (Muscimol antes do contexto)	G5 (n= 6) (Salina antes do contexto)	
Medidas espaço-temporais					
Caixa moradia	562,8 ± 2,72	577,0 ± 9,87	581,7 ± 2,80	577,3 ± 6,53	2,38; 0,13
Corredor	37,15 ± 2,72	22,96 ± 9,87	18,28 ± 2,80	22,71 ± 6,53	2,37; 0,13
Caixa de comida	0,0 ± 0,0	0,40 ± 0,40	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0; 0,0
Itens comportamentais					
Exploração	77,19 ± 4,97	79,49 ± 17,77	76,64 ± 5,55	64,79 ± 7,10	0,50; 0,48
Crouch sniff	105,4 ± 5,31	101,9 ± 9,70	93,08 ± 12,37	75,09 ± 25,87	0,22; 0,63
Stretch attend	22,29 ± 6,40	26,31 ± 8,33	27,61 ± 3,51	21,67 ± 1,68	0,82; 0,37
Stretch approach	4,89 ± 2,80	4,35 ± 2,21	5,66 ± 1,77	2,47 ± 1,61	0,38; 0,53
Freezing	385,3 ± 9,77	383,1 ± 30,46	394,7 ± 20,16	434,6 ± 31,15	0,75; 0,39

Os valores estão expressos em média ± erro padrão do tempo em segundos, durante um período de observação de 10 minutos.

Durante a exposição ao contexto, em contraste, a ANOVA revelou diferenças significativas de todas as medidas espaço-temporais, tempo que os animais passaram em *crouch sniff* e *stretch attend*, e para o tempo gasto em exploração tanto no efeito tipo de droga (salina x muscimol; $F_{(1, 21)} > 12,05$; $p < 0,002$), quanto para o efeito tempo de injeção (antes da exposição ao gato x antes da exposição ao contexto; $F_{(1, 21)} > 12,19$; $p < 0,002$). Adicionalmente, o teste também mostrou uma interação significativa entre o tempo da injeção e o tipo de droga injetada (ver Tabela 4). Para as variáveis de tempo gasto em *freezing* e *stretch approach*, o teste não mostrou diferenças entre os grupos (Tabela 4). Por simples inspeção visual do Gráfico 1, fica claro que quando o muscimol é injetado antes da exposição ao gato, os comportamentos de defesa contextuais são reduzidos, diminuindo o tempo gasto na caixa moradia, aumentando o tempo gasto no corredor e caixa de comida, e aumentando a exploração enquanto diminui drasticamente os comportamentos de avaliação de risco, como o *crouch sniff* e *stretch attend*.

Tabela 4. Dados do teste comportamental de exposição ao contexto dos grupos inativados com muscimol e respectivos controles.

	Grupos				Interação
	G2 (n= 6) (Muscimol antes do gato)	G3 (n= 6) (Salina antes do gato)	G4 (n= 7) (Muscimol antes do contexto)	G5 (n= 6) (Salina antes do contexto)	F (1, 21); p
Medidas espaço-temporais					
Caixa moradia	225,1 ± 37,03	578,1 ± 5,59	547,9 ± 14,96	589,8 ± 5,91	60,18; < 0,001
Corredor	233,0 ± 32,15	21,50 ± 5,54	52,15 ± 14,96	10,19 ± 5,91	22,16; < 0,001
Caixa de comida	141,9 ± 42,52	0,40 ± 0,40	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	12,05; 0,002
Itens comportamentais					
Exploração	496,1 ± 17,72	159,2 ± 24,72	143,5 ± 6,31	140,2 ± 6,31	118,73; < 0,001
<i>Crouch sniff</i>	16,27 ± 4,19	298,2 ± 23,63	333,0 ± 13,44	295,1 ± 13,66	109,62; < 0,001
<i>Stretch attend</i>	9,05 ± 3,25	79,62 ± 6,01	64,19 ± 7,75	94,32 ± 6,79	10,04; 0,004
<i>Stretch approach</i>	20,86 ± 6,45	11,74 ± 6,556	17,09 ± 5,81	15,27 ± 1,93	0,42; 0,52
<i>Freezing</i>	0,0 ± 0,0	34,85 ± 4,88	38,06 ± 15,63	52,44 ± 13,16	0,84; 0,36

Os valores estão expressos em média ± erro padrão do tempo em segundos, durante um período de observação de 10 minutos.

4.1.3 Análise da expressão de Fos no PMD e PAGdl durante a exposição ao contexto

Na presente investigação nós também analisamos a expressão de Fos no núcleo pré-mamilar dorsal (PMD) e porção dorsolateral da matéria cinzenta periaquedutal (PAGdl; para fotomicrografias em campo claro da imuno-histoquímica para detecção de Fos, ver Figuras 3 e 4), dois sítios neurais que são conhecidos por apresentar um aumento na expressão dessa proteína quando o animal é exposto a um ambiente hostil relacionado com a presença prévia de um predador (exposição ao contexto; CANTERAS et al., 1997; CEZARIO et al., 2008; COMOLI; RIBEIRO-BARBOSA; CANTERAS, 2003). Assim como na análise comportamental, primeiramente nós comparamos os animais não operados do grupo G1 com os animais que tiveram a implantação de cânulas e injeção de salina (G3 e G5, antes da exposição ao gato e antes da exposição ao contexto, respectivamente). Assim como mostrado

na Tabela 5, a ANOVA não mostrou diferenças na densidade de neurônios Fos+ nem no PMD ($F_{(2, 12)} = 1,53$; $p = 0,25$) e nem na PAGdl ($F_{(2, 12)} = 2,47$; $p = 0,12$) entre os grupos G1 (não operados), G3 (injeção de salina antes da exposição ao gato) e G5 (injeção de salina antes da exposição ao contexto).

Gráfico 1. Medidas espaço-temporais e comportamentais durante a exposição ao contexto predatório dos animais que receberam injeção de muscimol ou salina, antes da exposição ao gato ou antes da exposição ao contexto.

Tabela 5. Densidade de neurônios Fos+ no PMD e PAGdl após a exposição ao contexto predatório (controle).

	Grupo			F estatístico (2, 16); p
	G1 (n= 7) (não operado)	G3 (n= 6) (Salina antes do gato)	G5 (n= 6) (Salina antes do contexto)	
PMD	938,3 ± 38,15	814,9 ± 52,41	891,8 ± 58,12	1,53; 0,25
PAGdl	495,0 ± 17,88	443,4 ± 18,62	447,3 ± 18,31	2,47; 0,12

Valores estão expressos em média ± erro padrão do número de neurônios Fos +/mm²

Assim, os animais dos grupos G3 e G5 foram usados como controles e comparados então com os animais dos grupos G2 (injeção de muscimol antes da exposição ao gato) e G4 (injeção de muscimol antes da exposição ao contexto) por meio de uma *two-way* ANOVA univariada com um design fatorial 2x2. A ANOVA revelou que a densidade de neurônios Fos+ tanto no PMD quanto na PAGdl foi significativamente diferente para ambos os efeitos principais, tanto para o tipo de droga injetada (salina x muscimol; $F_{(1, 16)} > 106,30$), quanto para o tempo de injeção (antes da exposição ao gato x antes da exposição ao contexto $F_{(1, 16)} > 96,10$). Ainda, a interação entre os efeitos também apresentou diferenças significativas (ver Tabela 6). Como mostrado no Gráfico 2, por simples inspeção visual, fica evidente que os animais que receberam a injeção de muscimol antes da exposição ao gato (G2) apresentaram uma redução drástica na densidade de neurônios Fos+, tanto no PMD, quanto na PAGdl, quando comparados aos outros grupos.

Tabela 6. Densidade de neurônios Fos+ no PMD e PAGdl após a exposição ao contexto predatório (muscimol).

	Grupo				Interação F (1, 21); p
	G2 (n= 6) (Muscimol antes do gato)	G3 (n= 6) (Salina antes do gato)	G4 (n=7) (Muscimol antes do contexto)	G5 (n= 6) (Salina antes do contexto)	
PMd	55,18 ± 3,56	814,9 ± 52,41	793,8 ± 27,98	891,8 ± 58,12	63,27; <0,001
PAGdl	138,9 ± 5,22	443,4 ± 18,62	443,8 ± 6,02	447,3 ± 18,31	121,53; <0,001

Valores estão expressos em média ± erro padrão do número de neurônios Fos+/mm²

Gráfico 2. Densidade de neurônios Fos+ no PMd e PAGdl após a exposição ao contexto predatório de animais que receberam injeção de muscimol ou salina, antes da exposição ao gato ou antes da exposição ao contexto.

Figura 3. Fotomicrografias em campo claro de cortes submetidos a reação imuno- histoquímica para detecção da proteína Fos no PMD. Em A, Grupo 1 (não operado). B, Grupo 2 (injeção de muscimol no AMv antes da exposição ao gato). C, Grupo 3 (injeção de salina no AMv antes da exposição ao gato). D, Grupo 4 (injeção de muscimol no AMv antes da exposição ao contexto). E, Grupo 5 (injeção de salina no AMv antes da exposição ao contexto). Observar o grande número de neurônios Fos+ na parte ventrolateral do PMD de todos os grupos, exceto grupo 2 (B). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; PMDdm, núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo, parte dorsomedial; PMDvl, núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo, parte ventrolateral.

Figura 4. Fotomicrografias em campo claro de cortes submetidos a reação imuno-histoquímica para detecção da proteína Fos na PAG. Em **A**, Grupo 1 (não operado). **B**, Grupo 2 (injeção de muscimol no AMv antes da exposição ao gato). **C**, Grupo 3 (injeção de salina no AMv antes da exposição ao gato). **D**, Grupo 4 (injeção de muscimol no AMv antes da exposição ao contexto). **E**, Grupo 5 (injeção de salina no AMv antes da exposição ao contexto). Observar o grande número de neurônios Fos+ na PAGdl de todos os grupos, exceto grupo 2 (**B**). Abreviaturas: AQ, aqueduto cerebral; PAGdl, matéria cinzenta periaquedutal, parte dorsolateral; PAGdm, matéria cinzenta periaquedutal, parte dorsomedial; PAGl, matéria cinzenta periaquedutal, parte lateral; SOM, região supra-oculomotora.

4.2 Experimento 2 – Injeção iontoforética do PHA-L no AMv

Nos experimentos 2 e 3 (de rastreamento anterógrado), selecionamos para a descrição o melhor caso de cada grupo de área. Através da técnica de rastreamento anterógrado de PHA-L, obtivemos um sítio de injeção nitidamente restrito a parte ventral do AM (Figura 5), sem, no entanto, haver espriamento do traçador para áreas vizinhas. De acordo com nossos dados, notamos que há um fluxo grande de projeções para regiões anteriores do córtex cerebral (na região pré-frontal) e outro fluxo que se dirige caudalmente (menos denso), no qual áreas do córtex parietal, occipital e hipocampal foram marcadas.

Figura 5 - Representação do sítio de injeção de PHA-L no AMv. Em A, uma fotomicrografia em campo claro de um corte corado pela Técnica de Nissl para delimitação citoarquitetônica da região do AMv. Em B, uma fotomicrografia em campo escuro de um corte contíguo do mesmo animal mostrando a injeção de PHA-L no AMv. As linhas tracejadas brancas mostram a divisão de núcleos da região feitos a partir da imagem A. Abreviaturas: AD, núcleo anterodorsal do tálamo; AMd, núcleo anteromedial do tálamo, parte dorsal; AMv, núcleo anteromedial do tálamo, parte ventral; AV, núcleo anteroventral do tálamo; CM, núcleo central medial do tálamo; fx, fórnice; IAD, núcleo interanterodorsal do tálamo; PT, núcleo paratenial; PVH, núcleo paraventricular do hipotálamo; PVT, núcleo paraventricular do tálamo; RE, núcleo reuniens; RT, núcleo reticular do tálamo; sm, estria medular; VAL, complexo ventral anterolateral do tálamo; ZI, zona incerta.

No córtex pré-frontal (CPF), as áreas pré-límbica (PL) e cingulada anterior (ACA) mostraram uma alta densidade de fibras anterogradamente marcadas, exibindo uma clara predileção para camadas do córtex situadas no terço médio (profundidade da camada III e camada V superficial) e para a camada I. Apesar da longa extensão no eixo rostro-caudal dessas áreas, podemos observar fibras desde o polo frontal até os segmentos da ACA localizada imediatamente acima do corpo caloso. Algumas fibras também podem ser visualizadas na área infra-límbica e porção mais anterior e medial do córtex orbital (ORBm; Figura 6).

Figura 6 - Projeções do AMv no CPF. As fotomicrografias em campo escuro mostram uma sequência rostro-caudal de cortes, desde o polo frontal até os primeiros cortes após o início do corpo caloso. Notar que as projeções para as áreas PL e ACA são muito densas e se estendem por todo o eixo rostro-caudal. Abreviaturas: ACAd, área cingulada anterior, parte dorsal; ACAv, área cingulada anterior, parte ventral; IL, área pré-límbica; MOs, área somatomotora secundária; ORBm, área orbital, parte medial; PL, área pré-límbica; TTd, *taenia tecta*, parte dorsal.

Ao observar o fluxo de projeções que alcançam regiões corticais mais posteriores, uma área específica e componente da formação hipocampal chama a atenção por sua densíssima quantidade de fibras: o pré-subiculum (PRE). Esta área, juntamente com as áreas do CPF já descritas, são sem dúvida os principais campos aferentados pelo AMv. Ainda na formação hipocampal, uma substancial quantidade de fibras anterogradamente marcadas pode ser observada na porção mais caudal do córtex entorrinal lateral (ENTl), com algumas fibras nas camadas superficiais do subículo ventral (SUBv) e área CA1. Adicionalmente, notamos uma densa quantidade de fibras na área visual antero e posteromedial (VISam; VISpm; com considerável extensão rostro-caudal) e uma quantidade muito discreta de fibras nas camadas superficiais da parte ventral do córtex retrosplenial (RSPv). A área perirrinal (PERI), apesar de ostentar fibras extremamente delgadas, também é um campo de projeção do AMv (Figura 7).

Figura 7 - Projeções do AMv para regiões corticais posteriores. As fotomicrografias em campo escuro mostram uma sequência rostro-caudal de cortes na qual podemos observar uma extensa marcação em toda área VISam e VISpm. Em C, D e E, notar a grande quantidade de fibras que atingem o PRE, na formação hipocampal. Podemos ainda perceber uma discreta quantidade de fibras no córtex RSPv (C), área PER (C e D), córtex ENTI (D, E e F) e SUBv (C, D e E). Abreviaturas: CA1, área CA1, Corno de Ammon; ECT, área ectorrinal; ENTI, área entorrinal, parte lateral; ENTm, área entorrinal, parte medial; PAR, parassubiculum; PER, área perirrinal; PRE, pré- subiculum; RSPagl, área retrosplenial agranular, parte lateral; RSPd, área retrosplenial, parte dorsal; RSPv, área

retroesplenial, parte ventral; SUBv, subiculum, parte ventral; TEa, áreas associativas temporais; VISam, área visual anteromedial; VISp, área visual primária; VISpm, área visual posteromedial.

4.3 Experimento 3 - Rastreamento anterógrado com BDA das principais áreas corticais (ACA, PL, RSP e VIS) que são aferentadas pelo AMv.

4.3.1 Injeção iontoforética de BDA na área cingulada anterior (ACA)

A injeção de BDA na ACA (abrangendo sua parte dorsal e ventral) mostrou que esta área se projeta para diversas áreas corticais e também para a formação hipocampal. Por análise qualitativa, observamos projeções densas para a parte ventral da área orbital (ORBv), área PL, área VISam, RSPv, e para o PRE, na formação hipocampal. Na região parietal, a área associativa posterior (PTLp) apresentou projeção moderada/densa, enquanto áreas como a parte ventrolateral da área orbital (ORBvl), área somatomotora primária (MOp), área visual posteromedial (VISpm), e camadas profundas da área entorrinal medial (ENTm), receberam projeções moderadas. Finalmente, outras áreas foram fracamente aferentadas pela ACA, como a área ORBm, área infra-límbica (ILA), área somatosensorial primária (SSp), área retrosplenial agranular (RSPagl) e retrosplenial dorsal (RSPd), e setores da região do sulco rinal, como a área perirrinal (PERI) e ectorrinal (ECT). Para visualização do sítio de injeção e respectivas projeções, ver Figura 8 e 12A.

4.3.2 Injeção iontoforética de BDA na área pré-límbica (PL)

Neste experimento observamos que a área PL projeta-se para algumas áreas que são alvos da ACA, mas que também se projeta diferencialmente para diversos campos. Assim, a área ORBv, a parte ventral da ACA e a parte anterior do núcleo basolateral da amígdala (BLAa) são os campos terminais mais densos da área PL. Na sequência, observamos projeções moderadas na área ORBm, área ILA e área VISam. Escassas fibras ainda foram observadas na parte posterior do núcleo basomedial da amígdala (BMAp), área MOp, RSPv, PERI, e na camadas intermediárias da área entorrinal lateral (ENTl). Para visualização do sítio de injeção e respectivas projeções, ver Figura 9 e 12 B.

Figura 8. Projeções corticais a partir da área cingulada anterior (ACA). Em C', a fotomicrografia de campo escuro mostra o local de injeção do traçador. Os desenhos esquemáticos (de A - G) mostram o nível anteroposterior do corte em relação ao bregma (β), e os quadrados em negrito indicam a região em que as fotomicrografias em campo escuro (em destaque) foram feitas para evidênciação dos campos terminais, com a devida divisão de áreas fornecida para cabeças de seta e respectivas escalas. Abreviaturas: ACA_d, área cingulada anterior, parte dorsal; ACA_v, área cingulada anterior, parte ventral; DG, giro denteado; ECT, área ectorrinal; ENTI, área entorrinal, parte lateral; ENTm, área entorrinal, parte medial; ILA, área infra-límbica; MO_p, área somatomotora primária; MO_s, área somatomotora secundária; ORB_m, área orbital, parte medial; ORB_v, área orbital, parte ventral;

ORBvl, área orbital, parte ventrolateral; PAR, parassubiculum; PERI, área perirrinal; PL, área pré-límbica; PRE, pré-subiculum; PTLp, região parietal, áreas associativas posteriores; RSPagl, área retrosplenial agranular, parte lateral; RSPd, área retrosplenial, parte dorsal; RSPv, área retrosplenial, parte ventral; SSp, área somatosensorial primária; TEa, áreas associativas temporais; VISam, área visual anteromedial; VISp, área visual primária; VISpm, área visual posteromedial.

Figura 9. Projeções corticais a partir da área pré-límbica (PL). Em **B'**, a fotomicrografia de campo escuro mostra o local de injeção do traçador. Os desenhos esquemáticos (de **A - F**) mostram o nível anteroposterior do corte em relação ao bregma (β), e os quadrados em negrito indicam a região em que as fotomicrografias em campo escuro (em destaque) foram feitas para evidenciar os campos terminais. Em **D'**, a linha pontilhada delimita a região da amígdala e as setas indicam o nome dos respectivos núcleos. A escala em **F'** se aplica a todas as fotomicrografias desta figura. Abreviaturas: ACAd, área cingulada anterior, parte dorsal; ACAv, área cingulada anterior, parte ventral; BLAa, núcleo basolateral da amígdala, parte anterior; BLAp, núcleo basolateral da amígdala, parte posterior; BMAp, núcleo basomedial da amígdala, parte posterior; ECT, área ectorrinal; ENTl, área entorrinal, parte lateral; ILA, área infra-límbica; LA, núcleo lateral da amígdala; MOp, área somatomotora primária; MOs, área somatomotora secundária; ORBm, área orbital, parte medial; ORBv, área orbital, parte ventral; PERI, área perirrinal; PL, área pré-límbica; RSPagl, área retrosplenial agranular, parte lateral; RSPd, área retrosplenial, parte dorsal; RSPv, área retrosplenial, parte ventral; SSp, área somatosensorial primária; VISam, área visual anteromedial.

4.3.3 Injeção iontoforética de BDA na parte ventral da área retrosplenial (RSPv)

O amplo sítio de injeção observado na área RSPv revelou que essa área projeta-se densamente para a área VISam, parte dorsal da área RSP (RSPd), pós-subiculum (POST) e observamos uma grande quantidade de fibras no PRE e ACA. Na sequência, a parte lateral da área retrosplenial agranular (RSPagl), o parassubiculum (PAR), e tanto a parte dorsal quanto a ventral do subiculum (SUBd e SUBv), exibiram uma quantidade moderada de fibras. Por fim, notamos fibras muito curtas e delgadas na camada intermediária e profunda da área ENTl, camadas profundas da área ENTm, e área ECT. Para visualização do sítio de injeção e respectivas projeções, ver Figura 10 e 12 C.

4.3.4 Injeção iontoforética de BDA na área visual anteromedial (VISam)

A área VISam envia densas projeções para a área VISam contralateral, área visual posteromedial (VISpm; continuação da área VISam no eixo anteroposterior), área MOp e ORBvl. Observamos também campos terminais com moderada densidade de fibras na ACAd, área PERI, área associativa temporal (TEa) e área ECT. Ainda, observamos discretas projeções para a área ORBm, RSPv, e camadas média e profunda da área ENTl. Para visualização do sítio de injeção e respectivas projeções, ver Figura 11 e 12 D.

Figura 10. Projeções corticais a partir da parte ventral da área retrosplenial (RSPv). Em C', a fotomicrografia de campo escuro mostra o local de injeção do traçador. Os desenhos esquemáticos (de A - D) mostram o nível anteroposterior do corte em relação ao bregma (β), e os quadrados em negrito indicam a região em que as fotomicrografias em campo escuro (em destaque) foram feitas para evidencição dos campos terminais. A escala em D'' se aplica a todas as fotomicrografias desta figura. Abreviaturas: ACAd, área cingulada anterior, parte dorsal; ACAv, área cingulada anterior, parte ventral; ECT, área ectorrinal; ENTl, área entorrinal, parte lateral; ENTm, área entorrinal, parte medial; MOs, área somatomotora secundária; PAR, parassubiculum; PERI, área perirrinal; PRE, pré-subiculum; POST, pós-subiculum; RSPagl, área retrosplenial agranular, parte lateral; RSPd, área retrosplenial, parte dorsal; RSPv, área retrosplenial, parte ventral; SUBd, subiculum, parte dorsal; SUBv, subiculum, parte ventral; VISam, área visual anteromedial; VISp, área visual primária.

Figura 11. Projeções corticais a partir da área visual anteromedial (VISam). Em D', a fotomicrografia de campo escuro mostra o local de injeção do traçador. Os desenhos esquemáticos (de A - F) mostram o nível anteroposterior do corte em relação ao bregma (β), e os quadrados em negrito indicam a região em que as fotomicrografias em campo escuro (em destaque) foram feitas para evidenciação dos campos terminais. A escala em F' se aplica a todas as fotomicrografias desta figura. Abreviaturas: ACAd, área cingulada anterior, parte dorsal; ACAv, área cingulada anterior, parte ventral; ECT, área entorrinal; ENTl, área entorrinal, parte lateral; ENTm, área entorrinal, parte medial; MOp, área somatomotora primária; MOs, área somatomotora secundária; ORBm, área orbital, parte medial; ORBvl, área orbital, parte ventrolateral; PERI, área perirrinal; PL, área pré-límbica; RSPagl, área retrosplenial agranular, parte lateral; RSPd, área retrosplenial, parte dorsal; RSPv, área retrosplenial, parte ventral; SSp, área somatosensorial primária; TEa, áreas associativas temporais; VISam, área visual anteromedial; VISp, área visual primária; VISpm, área visual posteromedial.

Figura 12. Esquema das principais projeções corticais das áreas ACA (A), PL (B), RSP (C) e VIS (D). As áreas com moldura em preto são aferentadas pelo AMv. A espessura das setas e linhas indica a densidade de uma projeção. As projeções para as demais áreas do córtex cerebral foram poupadas para melhor leitura dos circuitos. Abreviaturas: ACA, área cingulada anterior; BLAa, núcleo basolateral da amígdala, parte anterior; BMAp, núcleo basomedial da amígdala, parte posterior; ECT, área ectorrinal; ENTl, área entorrinal, parte lateral; ENTm, área entorrinal, parte medial; PERI, área perirrinal; PL, área pré-límbica; POST, pós-subiculum; PRE, pré-subiculum; RSP, área retrosplenial; VIS, área visual.

4.4 Experimento 4 - Análise da expressão de Fos em áreas corticais de animais controles e de animais submetidos a exposição ao predador

4.4.1 Considerações iniciais e explanação da análise

Neste estudo nós verificamos o padrão de ativação de áreas corticais de animais submetidos a exposição ao predador (n= 5) e de animais controle (n= 5), mediante a expressão de Fos. Assim, analisamos nas duas situações o padrão de ativação das áreas corticais PL, ACA, VISam e RSPv (que recebem projeções do AMv) com a de áreas topograficamente vizinhas, como a área infra-límbica (ILA; adjacente a área PL), área somatomotora secundária (MOs; adjacente a ACA), parte lateral da área retrosplenial agranular (RSPagl; adjacente a área VISam), e porção posterior da parte ventral da área retrosplenial (RSPv,p; caudal em relação a área RSPv). Na análise estatística, comparamos em blocos os dados da densidade de neurônios Fos+ de uma área que recebe projeções do AMv com os de sua área topograficamente adjacente, tanto de animais controles quanto de animais submetidos a exposição ao predador (Bloco 1: PL vs. ILA; Bloco 2: ACA vs. MOs, Bloco 3: VISam vs. RSPagl; Bloco 4: RSPv vs. RSPv,p). Assim, dentro de cada bloco, temos duas variáveis comportamentais (controle e exposição ao predador) e duas áreas corticais (uma área que faz parte da circuitaria do AMv, e outra controle). Para a análise usamos quatro ANOVAS univariadas, com o ajuste do α para 0,01 (Correção de Bonferroni). Após determinar se a interação entre as variáveis acima foi significativa, consideramos relevantes as seguintes comparações no pós-teste de Tukey:

1. Comparação da densidade de neurônios Fos+ entre a área que recebe projeções do AMv com a área cortical imediatamente adjacente nos animais do grupo controle (por exemplo, entre a área PL e ILA);
2. Comparação entre a ativação de uma área que recebe projeções do AMv com sua área cortical adjacente, mas agora em animais expostos ao predador.

4.4.2 Resultados

A análise estatística mostrou significância na interação entre as variáveis (áreas e grupo comportamental) nos quatro blocos de comparação:

-Bloco 1 (PL vs. ILA – Controle vs. exposto ao gato) – $F(1,8) = 155,73$; $p < 0,001$;

-Bloco 2 (ACA vs. MOs – Controle vs. exposto ao gato) – $F(1,8) = 478,44$; $p < 0,001$;

-Bloco 3 (VISam vs. RSPagl – Controle vs. exposto ao gato) – $F(1,8) = 173,40$; $p < 0,001$;

-Bloco 4 (RSPv vs. RSPv,p – Controle vs. exposto ao gato) – $F(1,8) = 15,82$; $p = 0,004$.

Para média e erro padrão da distribuição de neurônios Fos+ nas áreas corticais e nos dois grupos comportamentais, checar Tabela 7. As Figuras 13 e 14 mostram gráficos para inspeção visual da interação das variáveis dentro de cada bloco e imagens com fotomicrografias em campo claro de cortes reagidos em imuno- histoquímica para detecção da proteína Fos.

Nos animais controle (que não sofreram nenhum tipo de manipulação comportamental), detectamos um padrão basal de expressão de Fos em todas as áreas analisadas. O pós-teste de Tukey não mostrou significância na densidade de células Fos+ entre as áreas PL vs. ILA ($p = 0,99$), ACA vs. MOs ($p = 0,99$), VISam vs. RSPagl ($p = 0,99$) e RSPv vs. RSPv,p ($p = 0,99$).

A mesma comparação entre as áreas dos animais que foram expostos ao gato mostrou diferenças estatisticamente significantes na densidade de neurônios Fos+. Observamos uma elevada densidade de células imunorreativas em todas as áreas, no entanto, a densidade foi muito maior nas áreas corticais que recebem projeções do AMv (PL vs. ILA ($p = 0,0002$); ACA vs. MOs ($p = 0,0002$); VISam vs. RSPagl ($p = 0,0002$); RSPv vs. RSPv,p ($p = 0,002$)).

Tabela 7. Média da densidade de neurônios Fos+ nas áreas corticais de animais controle e expostos ao gato.

	<i>Grupo comportamental</i>	
	Controle (n = 5)	Exposto ao gato (n = 5)
<i>Área</i>		
PL	18,52 ± 2,49	662,29 ± 34,51
ILA	20,67 ± 1,59	389,02 ± 47,44
ACA	16,36 ± 1,36	661,05 ± 38,11
MOs	17,53 ± 0,91	169,23 ± 20,01
VISam	22,76 ± 1,36	739,23 ± 30,25
RSPagl	20,29 ± 1,08	318,1 ± 15,57
RSPv	20,34 ± 2,97	646,29 ± 62,83
RSPv,p	18,10 ± 1,09	260,80 ± 26,85

Os valores estão expressos em média ± erro padrão da densidade (células/mm²) de neurônios Fos+

Figura 13. Neurônios Fos+ nas áreas PL, ILA, ACA e MOs. As imagens **A** e **B** mostram fotomicrografias em campo claro das áreas PL e ILA, de animais controle e expostos ao predador, respectivamente, e, em **D** e **E**, das áreas ACA e MOs. Em **C** e **F**, os gráficos para inspeção visual indicam a média da densidade de neurônios Fos+ nas diferentes condições (controle e exposto ao gato) e nas áreas corticais analisadas. Abreviaturas: ACAd, área cingulada anterior, parte dorsal; ACAv, área cingulada anterior, parte ventral; ILA, área infra-límbica; MOs, área somatomotora secundária; PL, área pré-límbica.

Figura 14. Neurônios Fos+ nas áreas VISam, RSPagl, RSPv e RSPv,p. As imagens **A** e **B** mostram fotomicrografias em campo claro das áreas VISam e RSPagl, de animais controle e expostos ao predador, respectivamente, e, em **D**, **E**, **F** e **G**, das áreas RSPv e RSPv,p. Em **C** e **H**, os gráficos para inspeção visual indicam a média da densidade de neurônios Fos+ nas condições (controle e exposto ao gato) e nas áreas corticais analisadas. Abreviaturas: POST, pós-subiculum; RSPagl, área retrosplenial agranular, parte lateral; RSPd, área retrosplenial, parte dorsal; RSPv, área retrosplenial, parte ventral; RSPv,p, área retrosplenial, parte ventral, porção posterior; VISam, área visual anteromedial.

4.5 Experimento 5 – Lesões neuroquímicas com NMDA das principais áreas corticais aferentadas pelo AMv (ACA, PL, RSP e VISam) e da área MOs

Neste experimento, selecionamos para a análise somente os animais que exibiram lesões centradas exatamente nas áreas de interesse. Através da infusão de NMDA, obtivemos extensas lesões neuroquímicas bilaterais nas cinco áreas selecionadas para o estudo. Assim, aplicamos lesões nas áreas PL (n= 6), ACA (n= 6), VISam (n= 6) e RSP (n= 5), que são alvos de projeção do AMv, e em uma área controle que não é alvo de projeção do AMv (área somatomotora secundária; MOs; n= 5). A Figura 15 permite a observação das lesões neuroquímicas deste experimento, que aparecem geralmente como áreas pálidas (ou também mais escuras), denotando perda neuronal localizada e circunscrita.

4.5.1 Análise Comportamental: considerações iniciais e validação do grupo controle

Em nosso estudo com lesões neuroquímicas, selecionamos uma área cortical que não é alvo de projeção do AMv (a área somatomotora secundária; MOs), para usar como grupo controle de área. Assim, em ambos os tempos da análise (exposição ao gato e exposição ao contexto), comparamos inicialmente os dados do grupo de animais intactos (não operados; n=6) com o grupo de animais que receberam lesões bilaterais na área MOs. Esta análise nos diz se o grupo com lesões na área MOs pode ser usado como um grupo controle fidedigno na comparação com os demais grupos experimentais. Usamos um teste não paramétrico para avaliar os dados entre os dois grupos (Teste U de Mann-Whitney, com p significativo igual ou menor que 0,05). Comparamos então o tempo (em segundos) que os animais permaneceram nos diferentes compartimentos do aparato experimental (caixa moradia, corredor e caixa de comida), e em diferentes comportamentos, como exploração, avaliação de risco e *freezing*. Durante a exposição ao gato, o teste U de Mann-Whitney não detectou diferenças significativas nos parâmetros analisados entre o grupo intacto e o grupo com lesões na área MOs (caixa moradia, p=0,87; corredor, p=0,87; exploração, p=0,10; avaliação de risco, p=0,62; *freezing*, p=0,19). De forma geral, todos os animais passaram a maior parte do tempo na caixa moradia em intenso comportamento de *freezing*.

Figura 15. Cortes corados pela Técnica de Nissl para análise das lesões neuroquímicas feitas através da infusão de NMDA em áreas do córtex cerebral (organizadas em sentido rostro- caudal). Em A, B, D e E, lesões bilaterais nas áreas aferentadas pelo AMv (respectivamente: PL, ACA, VISam e RSP). Em C, lesão da área controle MOs. As cabeças de seta indicam os limites entre áreas. As linhas pontilhadas indicam a extensão da lesão. A escala em E corresponde a 1mm e se aplica a todas imagens. Abreviaturas: ACA, área cingulada anterior; ILA, área infra-límbica; MOp, área somatomotora primária; MOs, área somatomotora secundária; PL, área pré-límbica; RSPd, área retrosplenial, parte dorsal; RSPv, área retrosplenial, parte ventral; SUBd, subiculum, parte dorsal; TTd, *taenia tecta*, parte dorsal; VISam, área visual anteromedial; VISp, área visual primária.

A partir dos dados comportamentais obtidos no contexto, o teste U de Mann-Whitney também não mostrou diferenças significativas nas variáveis entre os grupos intacto e com lesões na área MOs (caixa moradia, $p=0,45$; corredor, $p=0,45$; exploração, $p=0,74$; avaliação de risco, $p=0,07$; *freezing*, $p=0,41$). Nesta fase do teste todos os animais passaram grande parte do tempo em comportamento de avaliação de risco, com pouca exploração, e permaneceram majoritariamente na caixa moradia. Ver Tabela 8 para mais detalhes sobre a média de tempo que os animais gastaram em cada comportamento em ambas as fases do teste, e Gráfico 3 para análise comparativa dos dados no momento do contexto.

Tabela 8. Dados comportamentais dos grupos controle na exposição ao predador e exposição ao contexto predatório

<i>Variável</i>	<i>Exposição ao predador</i>		<i>Valor de p</i>	<i>Exposição ao contexto predatório</i>		<i>Valor de p</i>
	Intacto (n= 6)	Lesão MOs (n=5)		Intacto (n= 6)	Lesão MOs (n= 5)	
Caixa moradia	569,53 ± 7,65	577,80 ± 2,24	0,87	591,26 ± 1,0	587,47 ± 1,62	0,45
Corredor	30,47 ± 7,65	22,19 ± 2,24	0,87	8,73 ± 1,0	12,52 ± 1,62	0,45
Exploração	49,85 ± 1,75	43,43 ± 4,09	0,10	118,44 ± 8,65	122,91 ± 10,82	0,74
Avaliação de risco	103,57 ± 18,55	86,97 ± 10,98	0,62	417,16 ± 13,44	459,54 ± 10,09	0,07
Freezing	454,89 ± 9,50	482,20 ± 13,93	0,19	33,48 ± 1,93	31,83 ± 1,35	0,41

Os valores estão expressos em média ± erro padrão do tempo em segundos, durante um período de observação de 10 minutos.

Gráfico 3. Análise dos dados comportamentais no momento do contexto, do grupo intacto e do grupo de animais com lesão na área MOs. Observar que não há diferenças estatisticamente significantes para as variáveis.

Uma vez mostrado que o grupo intacto não diferiu significativamente do grupo de animais com lesões na área MOs, adotaremos este último como grupo controle para comparação com os demais grupos de animais que receberam lesões nas áreas ACA, PL, VISam e RSP (alvos de projeção do AMv).

4.5.2 Exposição ao gato

Nesta análise comparamos os dados comportamentais do grupo controle (lesão da área MOs) com os outros quatro grupos experimentais com lesão nas áreas ACA, PL, VISam e RSP. Aqui, utilizamos o teste não paramétrico Kruskal-Wallis para avaliar em grupo cada item espaço-temporal e comportamental. Devido ao número de variáveis analisadas, aplicamos a correção de Bonferroni e o α foi corrigido para 0,01. De acordo com nossos dados, as lesões das áreas corticais MOs, ACA, PL, VISam e RSP não alteraram as respostas estereotipadas de medo frente ao predador, e o teste estatístico não foi capaz de mostrar significância em nenhuma das variáveis. Assim, os animais permaneceram na caixa moradia a maior parte do tempo ($H=0,28$; $p=0,99$), com uma breve visita ao corredor do aparato ($H=0,28$; $p=0,99$). Em termos comportamentais os animais apresentaram pouca exploração ($H=1,04$; $p=0,90$), considerável tempo em avaliação de risco ($H=0,25$; $p=0,99$), e exibiram *freezing* ($H=1,14$; $p=0,88$) na grande maioria do tempo do teste. Para mais detalhes, ver Tabela 9.

Tabela 9. Dados comportamentais dos animais com lesões em áreas aferentadas pelo AMv e da área MOs durante a exposição ao predador

<i>Variável</i>	<i>Grupo de lesão cortical</i>					<i>Estatística</i>
	MOs (n=5)	ACA (n=6)	PL (n=6)	VISam (n=6)	RSP (n=5)	<i>H; p</i>
Caixa moradia	577,80 ± 2,24	572,37 ± 6,09	575,68 ± 8,65	574,95 ± 5,34	575,38 ± 7,46	0,28; 0,99
Corredor	22,19 ± 2,24	27,62 ± 6,09	24,31 ± 8,66	25,04 ± 5,34	24,61 ± 7,45	0,28; 0,99
Exploração	43,43 ± 4,09	41,79 ± 8,58	41,13 ± 4,24	44,12 ± 5,66	45,71 ± 3,79	1,04; 0,90
Avaliação de risco	86,97 ± 10,98	86,76 ± 14,91	84,29 ± 19,70	80,43 ± 14,67	80,29 ± 7,64	0,25; 0,99
Freezing	482,20 ± 13,93	464,92 ± 18,77	472,41 ± 18,23	469,33 ± 13,37	462,34 ± 10,37	1,14; 0,88

Os valores estão expressos em média ± erro padrão do tempo em segundos, durante um período de observação de 10 minutos.

4.5.3 Exposição ao contexto predatório

A exemplo da última análise, comparamos no momento da exposição ao contexto predatório os dados espaço-temporais (tempo de permanência na caixa moradia, corredor e caixa de comida) e comportamentais (exploração, avaliação de risco, *freezing*) dos grupos experimentais com lesão nas áreas MOs, ACA, PL, VISam e RSP utilizando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Devido ao número de variáveis, o α foi corrigido para 0,008 (Correção de Bonferroni).

Mesmo com a correção de Bonferroni, o teste estatístico apontou uma grande diferença entre os grupos experimentais para todas as variáveis analisadas. De forma geral, observamos que, com exceção dos animais com lesão na área MOs, os animais dos demais grupos (lesão da ACA, PL, VISam e RSP) passaram pouco tempo na caixa moradia ($H=19,30$; $p=0,0007$), e exploraram tanto o corredor ($H=15,97$; $p=0,003$) quanto a caixa de comida ($H=18,79$; $p=0,0009$) do aparato experimental. Nos itens comportamentais, o teste apontou diferença significativa para a variável exploração ($H=21,33$; $p=0,0003$), avaliação de risco ($H=20,22$; $p=0,0005$) e *freezing* ($H=25,65$; $p<0,0001$). Basicamente, animais com lesões em áreas corticais que recebem projeções do AMv (ACA, PL, VISam e RSP), não exibiram comportamento de *freezing* e passaram a maior parte do tempo do teste explorando o aparato experimental. Para mais detalhes, ver Tabela 10 e Gráfico 4.

Tabela 10. Dados comportamentais dos animais com lesões em áreas aferentadas pelo AMv e da área MOs durante a exposição ao contexto predatório

<i>Variável</i>	<i>Grupo de lesão cortical</i>					<i>Estatística</i>
	MOs (n=5)	ACA (n=6)	PL (n=6)	VISam (n=6)	RSP (n=5)	<i>H; p</i>
Caixa moradia	587,47 ± 1,62	150,73 ± 11,31	272,36 ± 16,46	219,30 ± 26,38	137,62 ± 10,63	19,30; 0,0007
Corredor	12,52 ± 1,62	276,09 ± 12,63	222,77 ± 18,76	261,91 ± 23,63	303,92 ± 7,98	15,97; 0,003
Caixa de comida	0 ± 0	173,16 ± 16,25	104,86 ± 11,90	118,75 ± 4,80	158,45 ± 12,07	18,79; 0,0009
Exploração	122,91 ± 10,82	486,31 ± 5,90	371,77 ± 34,12	395,89 ± 9,20	437,01 ± 12,97	21,33; 0,0003
Avaliação de risco	459,54 ± 10,09	62,39 ± 3,64	148,12 ± 16,47	131,89 ± 13,43	91,32 ± 9,95	20,22; 0,0005
Freezing	31,83 ± 1,35	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	25,65; <0,0001

Os valores estão expressos em média ± erro padrão do tempo em segundos, durante um período de observação de 10 minutos.

Uma vez detectadas diferenças significativas na análise de grupo anteriormente descrita, nos questionamos se, individualmente, os grupos experimentais com lesão em áreas aferentadas pelo AMv seriam estatisticamente diferentes do grupo controle (lesão da área MOs) nos quesitos espaço-temporais e comportamentais. Para responder a essa pergunta, aplicamos o teste não paramétrico U de Mann-Whitney com a correção de Bonferroni ($\alpha=0,013$) para a comparação em pares (MOs vs. ACA, MOs vs. PL, MOs vs. VISam, MOs vs. RSP) de cada variável (caixa moradia, caixa de comida, corredor, exploração, avaliação de risco, *freezing*). Todas as variáveis comparadas entre todas as combinações foram significativamente diferentes. Devido a quantidade de comparações, os dados foram organizados na Tabela 11.

Grafico 4. Análise em grupo para cada variável espaço-temporal e comportamental no momento da exposição ao contexto predatório. Observar que o teste de Kruskal-Wallis detectou diferenças significativas em todos os parâmetros analisados.

Tabela 11. Comparações das áreas corticais aferentadas pelo AMv com a área controle (MOs)

<i>Variável</i>	<i>Comparações</i>			
	MOs vs. ACA	MOs vs. PL	MOs vs. VISam	MOs vs. RSP
Caixa moradia	0,008	0,012	0,012	0,008
Corredor	0,008	0,012	0,012	0,008
Caixa de comida	0,005	0,007	0,007	0,005
Exploração	0,008	0,012	0,012	0,008
Avaliação de risco	0,008	0,012	0,012	0,008
<i>Freezing</i>	0,003	0,007	0,007	0,003
Valores de p				

5 DISCUSSÃO

5.1 O papel do tálamo na memória aversiva

O trabalho de Carvalho-Netto et al. (2010) mostrou que lesões do AMv abolem as respostas de defesa no contexto previamente associado ao predador. Todavia, não pôde determinar se este déficit era devido a problemas na aquisição da memória contextual ou na expressão das respostas de medo contextual. No Experimento 1 do presente estudo realizamos inativações no AMv com muscimol antes da exposição ao gato (Grupo 2), para verificar se o núcleo estaria envolvido na aquisição da memória aversiva, e inativações antes da exposição ao contexto predatório (Grupo 4), para verificar se o núcleo estaria envolvido na expressão dos comportamentos de defesa relacionados a memória aversiva. A dinâmica de eventos moleculares relacionados aos processos de memória (aquisição, consolidação e expressão) possui janelas temporais específicas e são melhores detalhadas na revisão de Abel e Lattal (2001).

Nossos resultados corroboram os de Carvalho-Netto et al. (2010) e adiciona novos dados à literatura. De forma semelhante, mostramos que o AMv não participa na organização das respostas de defesa inatas (anti-predatórias), mas que certamente influencia processos cognitivos relacionados a memória aversiva. Esses dados podem ser interpretados no contexto de que o AM é classificado como um núcleo talâmico de primeira ordem, que, por definição, são núcleos que recebem *drivers* (aferências de vias ascendentes que têm alta probabilidade de gerar potenciais de ação em neurônios talâmicos) e passam informações para áreas corticais (GUILLERY, 1995; SHERMAN, 2013). No que se refere a projeções, veremos na sequência que o AMv é constituído por um tipo celular que envia fibras para camadas distintas de diferentes áreas corticais, e que certamente deve influenciar diversos aspectos do processamento cognitivo.

Nossos dados mostram que o AMv está envolvido na aquisição da memória de medo ao predador, mas não parece influenciar a expressão da resposta contextual anti-predatória. Assim, diferentemente do que ocorreu com o grupo que teve o AMv inativado antes do contexto, o grupo inativado antes da exposição ao gato apresentou uma redução significativa das respostas de defesa contextuais. Notamos neste grupo uma queda acentuada nos comportamentos de avaliação de risco como *crouch sniff* e *stretch attend*, bem como um aumento dos comportamentos de exploração, como *locomotion* e *up right position*. Na avaliação espaço-temporal os grupos controles e o grupo com o AMv inativado antes do contexto (Grupo 4) passaram a grande maioria do tempo na caixa moradia, com curtíssimos ou nenhum período de exploração no corredor. Por outro lado, os animais do Grupo 2 (AMv

inativado antes da exposição ao gato) permaneceram mais da metade do tempo no corredor e na caixa de comida (ver Tabela 4, nos resultados). Também foi mostrado nos animais com lesão do tálamo anterior, utilizando-se o condicionamento clássico com choque nas patas, que as respostas de medo contextuais são mais instáveis, apresentando maior grau de extinção (MARCHAND et al., 2013). Tanto em nosso paradigma comportamental quanto no modelo de choque nas patas envolvendo o contexto (local associado ao choque), o animal provavelmente depende do hipocampo para adquirir e consolidar a memória espacial que está relacionada ao evento traumático. De fato, lesões no hipocampo ventral e dorsal resultam em déficits de processamento da memória de medo contextual (BARRIENTOS; O'REILLY; RUDY, 2002; BAST; ZHANG; FELDON, 2003; MAREN; HOLT, 2004; RUDY; BARRIENTOS; O'REILLY, 2002; RUDY; MATUS-AMAT, 2005; ZHANG; BAST; FELDON, 2001), embora um estudo aponte papéis diferentes do hipocampo ventral e dorsal neste processamento (HUNSAKER; KESNER, 2008).

5.2 Alvos corticais a partir do AMv

Vários estudos hodológicos já foram realizados a partir do AM, e, de acordo com o estudo de Canteras e Swanson (1992), o PMD (sítio hipotalâmico mais responsivo a uma ameaça predatória real e contextual), projeta-se densamente para a parte ventral do AM. Interessantemente, as partes dorsal e ventral do AM são constituídas por diferentes tipos de neurônios de projeção cortical (CLASCÁ; RUBIO-GARRIDO; JABAUDON, 2012). A parte dorsal possui um misto de neurônios do tipo *M-type* (focal) e *M-type* (multiareal). Os neurônios do tipo *M-type* (focal) enviam projeções majoritariamente para as camadas supragranulares (parte mais superficial das camadas I, II e III) de uma mesma coluna em uma área cortical. Os neurônios do tipo *M-type* (multiareal) enviam projeções para as camadas I e Va de uma mesma coluna cortical, mas também para as camadas Ia, III, IV e Va de outra coluna. Diferente da parte dorsal, na parte ventral do AM há uma predominância de neurônios do tipo *M-type* (multiareal). Isto corrobora nosso dado hodológico, que mostra por exemplo que o AMv se projeta para camadas distintas de diferentes áreas corticais. Essas diferenças podem refletir em aspectos distintos no mecanismo de transdução pós-sináptica ou valor computacional dentro de um circuito cortical (CASTRO-ALAMANCOS; CONNORS, 1997; LARKUM; SENN; LÜSCHER, 2004; MEYER et al., 2010; PETREANU et al., 2009; SPRATLING, 2002; VIAENE; PETROF; SHERMAN, 2011).

Assim, fizemos uma injeção de PHA-L exatamente na parte ventral do AM, como pode ser observado nos resultados (Experimento 2). Nossos dados conectivos corroboram e modificam em parte o que já era conhecido a respeito do padrão de projeção cortical do AM. De forma geral, os estudos anteriores mostram que o AM se projeta para as áreas PL, ACA, RSPv, PRE e PERI (RISOLD; SWANSON, 1995; SHIBATA, 1993a, b; VAN GROEN; KADISH; WYSS, 1999). Nossos dados indicam que o AMv também se projeta densamente para setores específicos do córtex parietal, a saber: as áreas VISam e VISpm. A projeção do AM para setores específicos do córtex parietal também foi descrito por Van Groen, Kadish e Wyss (1999), que identificaram esta região como área 18b. Não pudemos constatar a partir do nosso rastreamento grande quantidade de projeções chegando até o córtex RSPv, e sim apenas algumas fibras muito delgadas situadas nas camadas mais superficiais. Provavelmente a diferença entre nosso resultado e os dados da literatura deve residir no fato da nossa injeção se restringir a parte ventral do AM. De particular interesse para este estudo, reportamos aqui que o AMv provê projeções muito mais densas para a formação hipocampal do que anteriormente reportado (ver SHIBATA, 1993b; VAN GROEN; KADISH; WYSS, 1999), incluindo um denso terminal no PRE, substanciais projeções para a porção caudal da área ENTl, e algumas fibras também no SUBv e CA1.

Notoriamente, além de enviar projeções diretas para o SUBv e CA1, o AMv deve influenciar ambas as vias perforantes, que são as principais vias de entrada de informação para o hipocampo (SWANSON; KÖHLER; BJÖRKLUND, 1987). Assim, as projeções do AMv devem impactar tanto na via medial (que envolve o PRE e camadas superficiais da área ENTm), quanto na via lateral (através das projeções para as camadas superficiais da área ENTl; ver DING, 2013; SWANSON; KÖHLER; BJÖRKLUND, 1987). Adicionalmente a formação hipocampal, o AMv também deve influenciar sítios da amígdala envolvidos no condicionamento de medo. Assim como previamente observado, o AMv envia projeções moderadas para as áreas ao redor do sulco rinal (áreas PERI e ECT), que são conhecidas por trocar massivas projeções com o núcleo lateral da amígdala (SHI; CASSELL, 1999), local em que lesões citotóxicas parecem bloquear o condicionamento de medo frente a uma ameaça predatória (MARTINEZ et al., 2011). Juntos, os dados anatômicos sugerem que o AMv ocupa uma posição estratégica para enviar informações relacionadas ao predador para a circuitaria hipocampal e para a amígdala, e este fato deve explicar o papel deste núcleo talâmico na aquisição da memória aversiva.

5.3 Evidências funcionais do envolvimento de áreas corticais aferentadas pelo AMv no processamento da memória aversiva

Através de nossa análise da expressão de Fos, primeiramente demonstramos que, em animais controle (não manipulados no aspecto comportamental), o padrão basal de ativação das áreas corticais PL, ACA, VISam e RSP (que recebem projeções do AMv) e de suas áreas vizinhas (ILA, MOs, RSPagl e RSPv,p) não difere significativamente. Na sequência, constatamos que as áreas PL, ACA, VISam e RSPv estão diferencialmente ativadas durante a exposição ao predador quando comparadas com as áreas topograficamente adjacentes (MOs, ILA, RSPagl e RSPv,p). Ao analisar os dados podemos notar que, durante a exposição ao predador, mesmo as áreas corticais adjacentes àquelas que são aferentadas pelo AMv apresentam uma razoável expressão de Fos quando comparadas ao grupo controle. Provavelmente esta observação pode ser explicada com base no fato de que o estímulo predatório é suficiente para colocar o indivíduo em estado de alerta geral. Mesmo assim, a análise revelou que as áreas corticais que são alvos de projeção do AMv apresentaram uma densidade muito maior de neurônios Fos+ quando comparadas às áreas controles, e isso ajuda a sustentar a hipótese de que há um circuito cortical específico que é mobilizado quando o animal se depara com uma ameaça real de morte (e de que provavelmente essas áreas são necessárias para o processamento cognitivo de aprendizado e memória). A expressão diferencial de marcadores de ativação neural envolvendo áreas corticais e estados comportamentais distintos está descrita na literatura, e pode indicar a predileção de setores corticais pelo processamento de entradas e processos específicos (em nosso caso, a ativação de um circuito de áreas especialmente mobilizadas frente a uma ameaça predatória). Por exemplo, em um desses estudos os autores acharam uma expressão diferencial de *c-fos* no CPF de animais ansiosos que tiveram má desenvoltura em testes de tomada de decisão (neurônios *c-fos* positivos foram significativamente mais abundantes nas áreas PL e ILA, mas não na ACA; VISSER et al., 2011). Essa diferença não pôde ser constatada em animais em condições de normalidade.

Para verificar se as áreas corticais aferentadas pelo AMv estavam envolvidas no processamento da memória aversiva, realizamos lesões neuroquímicas bilaterais através da infusão de NMDA nas áreas PL, ACA, VISam e RSP, e também na área MOs (que não recebe projeções do AMv). Essas lesões não afetaram os comportamentos de defesa inatos dos animais frente ao predador, mas afetaram profundamente a resposta de medo aprendida no momento do contexto predatório. Inicialmente, verificamos que a lesão bilateral na área MOs

não foi capaz de produzir déficits comportamentais contextuais, preservando os mesmos comportamentos estereotipados de defesa de um grupo não operado. De forma geral, as lesões nas áreas corticais que são alvos de projeção do AMv causaram uma grande perda dos comportamentos de avaliação de risco comumente observados no contexto predatório, e elevaram o tempo de comportamento exploratório dos animais (inclusive com exploração da caixa de comida, local em que o gato fora colocado no dia anterior). Estes dados indicam que este circuito cortical específico influencia o processamento mnemônico de aprendizagem e memória que está relacionado a uma ameaça predatória.

Nos modelos de condicionamento de medo clássico (choque nas patas), dois estudos antigos mostram que lesões do córtex pré-frontal medial (CPFm) dorsal (compatível com a ACA) alteram a expressão do medo condicionado (aumentando os níveis de *freezing*), e que lesões do CPFm ventral (extensas lesões envolvendo as áreas PL e ILA) dificultam o processo de extinção do medo relacionado a um estímulo condicionado, mas não ao contexto (MORGAN; LEDOUX, 1995; MORGAN; ROMANSKI; LEDOUX, 1993). Por outro lado, trabalhos mais recentes mostraram que tanto a inativação da área PL quanto a da ACA antes do condicionamento ao som, bloqueou a memória aversiva durante a apresentação do estímulo condicionado (GILMARTIN; HELMSTETTER, 2010; ZHAO et al., 2005). Nesta mesma linha, um estudo mostra que micro-estimulações na área pré-límbica (PL) aumenta a expressão de medo condicionado e dificulta os processos de extinção de memória (VIDAL-GONZALEZ et al., 2006).

Nos testes de memória remota de medo (feitos em média 30 dias após o condicionamento), a inativação de áreas do CPFm leva ao déficit na expressão (*retrieval*) das respostas de defesa, enquanto aparentemente mantém a memória recente intacta (FRANKLAND et al., 2004; HOLAHAN; ROUTTENBERG, 2007). No entanto, vários trabalhos mostram o envolvimento do CPF no processo da memória recente aversiva. Einarsson e Nader (2012), por exemplo, inibiram farmacologicamente a ACA e observaram déficits no processo de aquisição da memória, e ainda mostraram que a infusão de anisomicina (inibidor de síntese proteica), bloqueou a consolidação e reconsolidação da memória recente (3 dias após o condicionamento) e remota (30 dias após o condicionamento). Dois outros estudos mostraram que a lesão ou inativação do CPFm afeta tanto a memória recente quanto a remota no paradigma de medo condicionado (BLUM; HEBERT; DASH, 2006; QUINN et al., 2008). A escassez e os dados contraditórios acerca dos papéis específicos de áreas do CPF no modelo de medo aprendido, demanda um olhar e uma investigação minuciosa sobre o envolvimento dessas áreas nestes processos. De fato, após uma revisão de

literatura do papel regulatório do CPF no aprendizado de medo (GILMARTIN; BALDERSTON; HELMSTETTER, 2014), os autores concluem que a investigação das possíveis diferenças funcionais de áreas do CPF ainda resta ser feita.

Ao contrário dos nossos dados, Kenne e Bucci (2008) não reportaram déficits comportamentais ao contexto e ao som relacionado ao choque nas patas após lesão da área posterior do córtex parietal (topograficamente semelhante a nossa área VISam). Entretanto, os autores reportaram no mesmo estudo que lesões eletrolíticas do córtex RSP bloquearam a expressão do medo contextual, mas não o medo relacionado ao som. Provavelmente o córtex RSP está envolvido no processamento do medo contextual através de suas projeções diretas para a formação hipocampal (PRE, ENTm, SUBv) e indiretas para o núcleo lateral (LA) da amígdala (via córtex VISam e ECT; SHI; CASSELL, 1999). Robinson et al. (2012) mostraram uma interação funcional entre o córtex RSP e a área POR, que trabalham como uma rede cortical necessária para o processamento da memória e o aprendizado do medo. Em nosso estudo, a lesão bilateral da área RSP gerou uma acentuada queda nas mensurações dos comportamentos de defesa contextuais, levando a um padrão semelhante ao observado nas lesões da ACA.

5.4 Os braços de projeção das áreas corticais aferentadas pelo AMv podem ajudar a explicar seu envolvimento no processamento da memória aversiva

Nesta seção abordaremos aspectos conectivos (e também funcionais) que podem dizer muito sobre as alterações comportamentais discutidas anteriormente. Por exemplo, discutiremos aqui as projeções das áreas aferentadas pelo AMv para outros setores corticais, bem como para estruturas sabidamente envolvidas no aprendizado e memória, como núcleos da amígdala e áreas da formação hipocampal.

Em uma visão geral das áreas corticais de nosso estudo, podemos citar que a ACA, além de se projetar e receber projeções para as outras áreas do circuito (como PL, VISam e RSPv), também se projeta densamente para sítios da formação hipocampal (PRE, SUBv e ENTm). A área RSP também provê massivas projeções para o PRE e POST, enquanto as áreas PL e VISam projetam-se fracamente para a área ENTl. Dados do laboratório dos Blanchard mostraram que lesões situadas no hipocampo ventral reduzem significativamente as respostas de defesa condicionadas anti-predatórias (PENTKOWSKI et al., 2006), além de que, o hipocampo, é classicamente conhecido por atuar como um armazenador temporário (entre 14 e 28 dias) da memória contextual (KIM; FANSELOW, 1992).

As distintas projeções da área PL em relação a ACA (já descritas na literatura; EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012; HEIDBREder; GROENEWEGEN, 2003), incluem um denso campo terminal no núcleo BLAa (e menos denso no BMAp). O BLA é descrito como um sítio neural crítico para a aquisição das respostas de medo condicionadas (DAVIS; WHALEN, 2001; LEDOUX, 2003) e tem conexões com o núcleo lateral da amígdala, o qual é essencial para a associação de estímulos pareados temporalmente (JOHANSEN et al., 2010; MAREN; QUIRK, 2004).

Todas as áreas corticais que recebem projeções do AMv projetam-se com maior ou menor magnitude para áreas corticais situadas ao redor do sulco rinal, como as áreas perirrinal (PERI) e ectorrinal (ECT). Observações pessoais de um experimento paralelo mostram que as áreas da região ao redor do sulco rinal enviam e recebem densíssimas projeções para o núcleo lateral da amígdala (LA). De acordo com Bucci, Phillips e Burwell (2000), tanto lesões eletrolíticas como neurotóxicas das áreas PERI e pós-rinal (POR) levam a um déficit significativo no processamento do medo contextual (paradigma do choque nas patas). As projeções a partir de áreas ao redor do sulco rinal para o núcleo LA (SHI; CASSELL, 1999) provavelmente são determinantes para processos de aprendizado e associação nesse caso: o núcleo LA é um sítio de plasticidade associativa, onde um estímulo incondicionado (em nosso caso a presença de um predador) causa a despolarização de neurônios piramidais, que provavelmente instrui plasticidade nas sinapses formadas pelo estímulo neutro (ambiente familiar) através de receptores NMDA (BLAIR et al., 2001; JOHANSEN et al., 2010; MAREN; QUIRK, 2004; ROGAN et al., 2000). Ainda, segundo a literatura, o núcleo LA manda projeções de volta para a área ECT e tem projeções diretas para áreas do hipocampo ventral, (Figura 16; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001), que está envolvido no aprendizado emocional (ROGERS; HUNSAKER; KESNER, 2006; YOON; OTTO, 2007).

Além do mapeamento funcional de áreas corticais envolvidas no processamento da memória aversiva, o presente estudo ajuda a corroborar o que estudos anteriores de nosso grupo têm mostrado: as respostas de defesa inatas são organizadas fundamentalmente por regiões subcorticais como núcleos da amígdala, hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal (CANTERAS et al., 1997; CEZARIO et al., 2008; MARTINEZ et al., 2011), e elucidando que o processamento cognitivo da memória emocional depende do núcleo AMv do tálamo e seus alvos corticais, que certamente servem como vias de acesso para que a informação ganhe acesso a áreas da amígdala e da formação hipocampal.

5.5 Circuitaria córtico-cortical a partir do AMv: evidências baseadas em dados conectivos

Após identificarmos os principais alvos corticais de projeção do AMv, fizemos novas injeções de traçador anterógrado nas áreas ACA, PL, VISam, RSPv. Ao contrário de estudos que mostram a área RSPv como um importante alvo de projeção do núcleo anteromedial do tálamo (VAN GROEN; KADISH; WYSS, 1999), não encontramos um campo de projeção denso a partir do AMv para esta área. No entanto a injeção de BDA na ACA mostrou que este sítio projeta-se densamente para o córtex RSP (assim como também projeta-se a área PL e a área VISam, embora em densidade muito menor), evidenciando o provável envolvimento desta região na circuitaria de processamento da memória aversiva.

A ACA parece ocupar uma posição nodal dentro deste circuito. Segundo nossos dados, a ACA recebe e envia projeções para todas as outras áreas do circuito (PL, VISam e RSP). Esse achado condiz com trabalhos anteriores da literatura, na qual as aferências da

ACA foram determinadas por rastreamento retrógrado com Fluoro-Gold (HOOVER; VERTES, 2007). Nesse mesmo estudo os autores descrevem ainda células retrogradamente marcadas na ACA e nos núcleos BLA e BMA da amígdala a partir da injeção de Fluoro-Gold na área PL. As densas projeções que observamos a partir da área RSPv para a ACA anterior também já foram descritas em trabalho anterior com o uso de BDA (SHIBATA; KONDOA; NAITO, 2004). Um estudo mostra células retrógradas na área VISam e ACA após injeção de Fluoro-Gold na área RSPv (VAN GROEN; WYSS, 2003). Na Figura 17 podemos observar um fluxograma que ilustra as conexões córtico-corticais mapeadas através de nossa pesquisa.

Figura 17. Desenho esquemático das principais conexões de áreas corticais que recebem projeções do AMv a partir de nosso estudo de rastreamento anterógrado. As áreas com moldura em preto de diferentes espessuras indicam a densidade da projeção que chega a partir do AMv. A espessura das linhas coloridas também indica o quanto uma projeção é ou não densa. Abreviaturas: ACA, área cingulada anterior; BLAa, núcleo basolateral da amígdala, parte anterior; BMAp, núcleo basomedial da amígdala, parte posterior; ECT, área ectorrinal; ENTI, área entorrinal, parte lateral; ENTm, área entorrinal, parte medial; PERI, área perirrinal; PL, área pré-límbica; POST, pós-subiculum; PRE, pré-subiculum; RSP, área retroesplênica; VIS, área visual.

Esta análise que denota a interconectividade entre este grupamento de áreas não havia ainda sido compilada em um trabalho e analisadas no contexto de um modelo comportamental. No entanto, em um trabalho muito recente do laboratório do Prof. Larry Swanson (BOTA; SPORNS; SWANSON, 2015), os pesquisadores analisaram muitos trabalhos da literatura para elaborar um “conectoma” de áreas do córtex cerebral de ratos. Este amplo estudo revelou através dos dados conectivos, uma organização tetra modular do córtex cerebral. De acordo com o estudo, as conexões intramodulares tendem a ser mais fortes, enquanto conexões intermodulares tendem a ser moderadas e assimétricas (diferentes densidades de projeção entre as áreas), o que pode implicar parcialmente em um viés do fluxo de informação através de determinados módulos do córtex cerebral. Brevemente e no contexto de nosso trabalho, por exemplo, as áreas ACA e RSPv pertencem ao Módulo 3 (módulo límbico dorsal), que possui conexões com a maioria das áreas da formação hipocampal (incluindo o pré-subiculum e também córtex ENTm). A área PL situa-se como um importante nodo do módulo límbico ventral (Módulo 4; com conexões amigdalares e algumas hipocampais - e também o córtex ENTl), e a área VISam pertence ao Módulo 1 (hemisférico), composto por áreas visuais, auditivas e áreas associativas. De fato, as conexões recíprocas entre as áreas ACA e RSP são muito densas (conexões intramodulares), por exemplo, enquanto as projeções da área PL para a área VISam e RSPv são fracas ou moderadas (intermodulares). Esta tendência (como os autores descrevem - e de fato temos densas projeções a partir da ACA (Módulo 3) para a área VISam (Módulo 1), o que indica que isso não necessariamente é uma regra), pode sugerir papéis diferentes dessas áreas nas etapas do processamento cognitivo de aprendizado e memória. Em nosso estudo constatamos que as áreas ACA e PL, por exemplo, projetam-se diferentemente para áreas ENTm e ENTl, as quais juntamente com o claustró, são as áreas mais conectadas com o resto do córtex cerebral e também densamente conectadas entre si (*rich-club nodes*).

O fato de que tanto o AMv quanto as áreas corticais PL, ACA, VISam e RSPv projetam-se para outros sítios do encéfalo, não exclui a possibilidade de que o circuito de áreas corticais responsáveis pelo processamento da memória de medo seja mais amplo do que aqui relatado. Portanto, apesar de que este foi um passo inicial para o conceito de módulos corticais, trabalhamos com o ensejo de que novos dados sejam adicionados a fim de melhor entender como o funcionamento dessas áreas influencia diferentes aspectos do processamento mnemônico.

6 CONCLUSÕES

O núcleo talâmico AMv está criticamente envolvido na aquisição, mas não na expressão dos comportamentos de defesa contextuais. A partir do AMv, áreas corticais específicas (ACA, PL, VISam e RSP) recebem, integram e enviam informações para áreas relacionadas ao processamento cognitivo de aprendizado e memória emocional, como a amígdala e hipocampo. Os dados obtidos através da análise da expressão de Fos e lesões neuroquímicas dessas áreas corticais sugerem que este circuito está criticamente envolvido no processamento da memória emocional aversiva, uma vez que observamos perdas comportamentais significativas de respostas inerentes à exposição do animal a um ambiente hostil.

REFERÊNCIAS*

- ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, p. 180-187, 2001.
- ADAMEC, R.; TOTH, M.; HALLER, J.; HALASZ, J.; BLUNDELL, J. A. comparison of activation patterns of cells in selected prefrontal cortical and amygdala areas of rats which are more or less anxious in response to predator exposure or submersion stress. **Physiology and Behavior**, v. 105, p. 628–638, 2012.
- BARRIENTOS, R. M.; O'REILLY, R. C.; RUDY, J. W. Memory for context is impaired by injecting anisomycin into dorsal hippocampus following context exploration. **Behavioral Brain Research**, v. 134, n. 1–2, p. 299–306, 2002.
- BAST, T.; ZHANG, W. N.; FELDON, J. Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: effects of local NMDA-receptor blockade and stimulation. **Hippocampus**, v. 13, n. 6, p. 657–75, 2003.
- BISSIÈRE, S.; PLACHTA, N.; HOYER, D.; MCALLISTER, K. H.; OLPE, H. R.; GRACE, A. A.; CRYAN, J. F. The rostral anterior cingulate cortex modulates the efficiency of amygdala-dependent fear learning. **Biological Psychiatry**, v. 63, p. 821–831, 2008.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; HORI, K. Ethoexperimental approaches to the study of defensive behavior. In: BLANCHARD, R. J., BRAIN, P. F., BLANCHARD, D. C., Parmigiani, S. (Ed.), **Ethoexperimental Approaches to the Study of Behavior**. Academic Publishers, Dordrecht, Kluwer, 1989. p. 114–136.
- BLAIR, H. T.; SCHAFE, G. E.; BAUER, E. P.; RODRIGUES, S. M.; LEDOUX, J. E. Synaptic plasticity in the lateral amygdala: A cellular hypothesis of fear conditioning. **Learning and Memory**, v. 8, p. 229–242, 2001.
- BLANCHARD, D. C.; LI, C. I.; HUBBARD, D.; MARKHAM, C. M.; YANG, M.; TAKAHASHI, L. K. Dorsal premammillary nucleus differentially modulates defensive behaviors induced by different threat stimuli in rats. **Neuroscience Letters**, v. 345, p. 145–148, 2003.
- BLUM, S.; HEBERT, A. E.; DASH, P. K. A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. **Neuroreport**, v. 17, p. 341–344, 2006.

***De acordo com:**

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

BOLLES, R. C. Species-specific defense reactions and avoidance learning. **Psychological Review**, v. 77, p. 32–48, 1970.

BOTA, M.; SPORNS, O.; SWANSON, L. W. Architecture of the cerebral cortical association connectome underlying cognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 112, p. 2093-2101, 2015.

BUCCI, D. J.; PHILLIPS, R. G.; AND BURWELL, R. D. Contributions of postrhinal and perirhinal cortex to contextual information processing. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, p. 882–894, 2000.

BURWELL, R. D.; SADDORIS, M. P.; BUCCI, D. J.; WIIG, K. A. Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 3826–3836, 2004.

CAMPOS, A. C.; FERREIRA, F. R.; DA SILVA JR., W. A.; GUIMARÃES, F. S. Predator threat stress promotes long lasting anxiety-like behaviors and modulates synaptophysin and CB1 receptors expression in brain areas associated with PTSD symptoms. **Neuroscience Letters**, v. 533, p. 34–38, 2013.

CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. The dorsal premammillary nucleus: An unusual component of the mammillary body. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 89, p. 10089-10093, 1992.

CANTERAS, N. S.; SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 360, p. 213–245, 1995.

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 Research Bulletin**, v. 44, p. 297–305, 1997.

CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, p. 481–491, 2002.

CANTERAS, N. S.; KROON, J. A. V.; DO-MONTE, F. H. M.; PAVESI, E.; CAROBREZ, A. P. Sensing danger through the olfactory system: The role of the hypothalamicdorsal premammillary nucleus. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, p. 1228–1235, 2008.

CARVALHO-NETTO, E. F.; MARTINEZ, R. C. R.; BALDO, M. V. C.; CANTERAS, N. S. Evidence for the thalamic targets of the medial hypothalamic defensive system mediating

emotional memory to predatory threats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 93, p. 479–486, 2010.

CASTRO-ALAMANCOS, M. A.; CONNORS, B. W. Thalamocortical synapses. **Progress in Neurobiology**, v. 51, p. 581–606, 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 preammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 1003–1015, 2008.

CLASCÁ, F.; RUBIO-GARRIDO, P.; JABAUDON, D. Unveiling the diversity of thalamocortical neuron subtypes. **European Journal of Neuroscience**, v. 35, p. 1524–1532, 2012.

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. **Behavioural Brain Research**, v. 138, p. 17–28, 2003.

DAVIS, M.; WHALEN, P. J. The amygdala: vigilance and emotion. **Molecular Psychiatry**, v. 6, p. 13–34, 2001.

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.

DING, S. L. Comparative anatomy of the prosubiculum, subiculum, presubiculum, postsubiculum, and parasubiculum in human, monkey, and rodent. **Journal of Comparative Neurology**, v. 521, p. 4145–4162, 2013.

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

EINARSSON, E. O.; NADER, K. Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear memory. **Learning and Memory**, v. 19, p. 449–452, 2012.

EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; MCNAUGHTON, B. L. The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. **Neuron**, v. 76, p. 1057–1070, 2012.

FANSELOW, M. S. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. **Psychonomic Bulletin & Review**, v. 1, p. 429–438, 1994.

FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B.; TALTON, L. E.; KACZMAREK, L.; SILVA, A. J. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. **Science**, v. 304, p. 881-883, 2004.

GILMARTIN, M. R.; HELMSTETTER, F. J. Trace and contextual fear conditioning require neural activity and NMDA receptor-dependent transmission in the medial prefrontal cortex. **Learning and Memory**, v. 17, p. 289–296, 2010.

GILMARTIN, M. R.; BALDERSTON, N. L.; HELMSTETTER, F. J. Prefrontal cortical regulation of fear learning. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 8, p. 455-464, 2014.

GOSWAMI, S.; RODRÍGUEZ-SIERRA, O.; CASCARDI, M.; PARÉ, D. Animal models of post-traumatic stress disorder: face validity. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, n. 89, p. 1-14, 2013.

GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, p. 651- 658, 2012.

GUILLERY, R. W. Anatomical evidence concerning the role of the thalamus in corticocortical communication: a brief review. **Journal of Anatomy**, v. 187, n. 3, p. 583–592, 1995.

HEIDBREDER, C. A.; GROENEWEGEN, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 27, p. 555–579, 2003.

HOLAHAN, M. R.; ROUTTENBERG, A. Post-translational synaptic protein modification as substrate for long-lasting, remote memory: an initial test. **Hippocampus**, v. 17, p. 93–97, 2007.

HOOVER, W. B.; VERTES, R. P. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. **Brain, Structure and Function**, v. 212, p. 149–179, 2007.

HUNSAKER, M. R.; KESNER, R. P. Dissociations across the dorsal-ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, n. 1, p. 61–9, 2008.

JOHANSEN, J. P.; HAMANAKA, H.; MONFILS, M. H.; BEHNIA, R.; DEISSEROTH, K.; BLAIR, H. T.; LEDOUX, J. E. Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 107, p. 12692–12697, 2010.

KATZ, I. K.; LAMPRECHT, R. Fear conditioning leads to alteration in specific genes expression in cortical and thalamic neurons that project to the lateral amygdala. **Journal of Neurochemistry**. doi: 10.1111/jnc.12983, 2014.

KEENE, C. S.; BUCCI, D. J. Contributions of the retrosplenial and posterior parietal cortices to cue-specific and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 122, p. 89–97, 2008a.

KEENE, C. S.; BUCCI, D. J. Neurotoxic lesions of retrosplenial cortex disrupt signaled and unsignaled contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 122, p. 1070–1077, 2008b.

KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v. 256, p. 675–676, 1992.

LARKUM, M. E.; SENN, W.; LÜSCHER, H. R. Top-down dendritic input increases the gain of layer 5 pyramidal neurons. **Cerebral Cortex**, v. 14, p. 1059–1070, 2004.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **The Annual Review of Neuroscience**, v. 23, p. 155–184, 2000.

LEDOUX, J. The emotional brain, fear, and the amygdala. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, p. 727–738, 2003.

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

MARCHAND, A.; FAUGÈRE, A.; COUTUREAU, E.; WOLFF, M. A role for anterior thalamic nuclei in contextual fear memory. **Brain, Structure and Function**, v. 219, p. 1575–86, 2013.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **The Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 897–931, 2001.

MAREN, S.; QUIRK, G. J. Neuronal signalling of fear memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p. 844–852, 2004.

MAREN, S.; HOLT, W. G. Hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats: muscimol infusions into the ventral, but not dorsal, hippocampus impair the acquisition of conditional freezing to an auditory conditional stimulus. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, n. 1, p. 97–110, 2004.

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. **Behavioural Brain Research**, v. 192, p. 185–190, 2008.

MARTINEZ, R. C., CARVALHO-NETTO, 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.

MEYER, H. S.; WIMMER, V. C.; HEMBERGER, M.; BRUNO, R. M.; DE KOCK, C. P.; FRICK, A.; SAKMANN, B.; HELMSTAEDTER, M. Cell type-specific thalamic innervation in a column of rat vibrissal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 20, p. 2287–2303, 2010.

MORGAN, M. A.; ROMANSKI, L. M.; LEDOUX, J. E. Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. **Neuroscience Letters**, v. 163, p. 109–113, 1993.

MORGAN, M. A.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 109, p. 681–688, 1995.

MOTTA, S. C.; GOTO, M.; GOUVEIA, F. V.; BALDO, M. V.; CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 106, p. 4870–4875, 2009.

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. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 2185–2196, 2006.

PETREANU, L.; MAO, T.; STERNSON, S. M.; SVOBODA, K. The subcellular organization of neocortical excitatory connections. **Nature**, 457, p. 1142–1145, 2009.

PETROVICH, G. D.; RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 374, p. 387–420, 1996.

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

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, p. 274–285, 1992.

QUINN, J. J.; MA, Q. D.; TINSLEY, M. R.; KOCH, C.; FANSELOW, M. S. Inverse temporal contributions of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex to the expression of long-term fear memories. **Learning and Memory**, v. 15, p. 368–372, 2008.

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. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1255–1263, 2005.

RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. Evidence for a hypothalamicocortical circuit mediating pheromonal influences on eyes and head movements. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99, p. 3898–3902, 1995.

ROBINSON, S.; POORMAN, C. E.; MARDER, T. J.; BUCCI, D. J. Identification of functional circuitry between retrosplenial and postrhinal cortices during fear conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, p. 12076–12086, 2012.

ROGAN, M. T.; WEISSKOPF, M. G.; HUANG, Y. Y.; KANDEL, E. R.; LEDOUX, J. E. Long term potentiation in the amygdala: Implications for memory formation. **Neuronal Mechanisms of Memory Formation**, (Ed.) Holscher C. Cambridge Univ Press, Cambridge, UK, 2000. p. 58–76.

ROGERS, J., HUNSAKER, M. R.; KESNER RP. Effects of ventral and dorsal CA1 subregional lesions on trace fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 86, p. 72–81, 2006.

RUDY, J. W.; BARRIENTOS, R. M.; O'REILLY, R. C. Hippocampal formation supports conditioning to memory of a context. **Behavioral Neuroscience**, v. 116, n. 4, p. 530–8, 2002.

RUDY, J. W.; MATUS-AMAT, P. The ventral hippocampus supports a memory representation of context and contextual fear conditioning: implications for a unitary function of the hippocampus. **Behavioral Neuroscience**, v. 119, n. 1, p. 154–63, 2005.

SILVA, B. A.; MATTUCCI, C.; KRZYWKOWSKI, P.; MURANA, E.; ILLARIONOVA, A.; GRINEVICH, V.; CANTERAS, N. S.; RAGOZZINO, D.; GROSS, C. T. Independent hypothalamic circuits for social and predator fear. **Nature Neuroscience**, v. 16, p. 1731 – 1733, 2013.

SHERMAN, S. M. The Function of Metabotropic Glutamate Receptors in Thalamus and Cortex. **The Neuroscientist**, v. 20, n. 2, p. 136–49, 2013.

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

SHIBATA, H. Efferent projections from the anterior thalamic nuclei to the cingulate cortex in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 330, p. 533– 542, 1993a.

SHIBATA, H. Direct projections from the anterior thalamic nuclei to the retrohippocampal region in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 337, p. 431– 445, 1993b.

SHIBATA, H.; KONDOA, S.; NAITO, J. Organization of retrosplenial cortical projections to the anterior cingulate, motor, and prefrontal cortices in the rat. **Neuroscience Research**, v. 49, p. 1–11, 2004.

SPRATLING, M. W. Cortical region interactions and the functional role of apical dendrites. **Behavioral and Cognitive Neuroscience**, v. 1, p. 219–228, 2002.

SWANSON, L. W. **Brain maps: Structure of the rat brain**. Amsterdam: (Ed.) Elsevier, 2004.

SWANSON, L. W.; KÖHLER, C.; BJÖRKLUND, A. The limbic region. I: the septohippocampal system. In: Hökfelt T, Björklund A, Swanson LW (eds) *Handbook of chemical neuroanatomy*, v. 5. Integrated Systems, **Elsevier**, Amsterdam, p. 125–277, 1987.

VAN GROEN, T.; KADISH, I.; WYSS, J. M. Efferent connections of the anteromedial nucleus of the thalamus of the rat. **Brain Research Review**, v. 30, p. 1– 26, 1999.

VAN GROEN, T.; WYSS, J. M. Connections of the Retrosplenial Granular b Cortex in the Rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 463, p. 249 –263, 2003.

VERBURG, K.; PERNA, G.; GRIEZ, E. A case study of the 35% CO₂ challenge. In: Griez, E.J.L. (Ed.). **Anxiety disorders: an introduction to clinical management and research**. Wiley, Chichester, NY, 2001. p. 22.

VIANNA, D. M.; GRAEFF, F. G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M. L. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. **Learning and Memory**, v. 8, p. 164–169, 2001.

VIAENE, A. P.; PETROF, I.; SHERMAN, S. M. Properties of the thalamic projection from the posterior medial nucleus to primary and secondary somatosensory cortices in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 108, p.18156–18161, 2011.

VIDAL-GONZALEZ, I; VIDAL-GONZALEZ, B.; RAUCH, S. L.; QUIRK, G. J. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. **Learning and Memory**, v. 13, p. 728- 733, 2006.

VISSER, L.; BAARS, A. M.; LAVRIJSEN, M.; VAN DER WEERD, C. M.; VAN DEN BOS, R. Decision-making performance is related to levels of anxiety and differential recruitment of frontostriatal areas in male rats. **Neuroscience**, v. 184, p. 97–106, 2011.

YOON, T.; OTTO, T. Differential contributions of dorsal vs.ventral hippocampus to auditory trace fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, p. 464-475, 2007.

ZHANG, W. N.; BAST, T.; FELDON, J. The ventral hippocampus and fear conditioning in rats: different anterograde amnesias of fear after infusion of N-methyl-D-aspartate or its noncompetitive antagonist MK-801 into the ventral hippocampus. **Behavioral Brain Research**, v. 126(1–2), p. 159–74, 2001.

ZHAO, M. G.; TOYODA, H.; LEE, Y. S.; WU, L. J.; KO, S. W.; ZHANG, X. H.; JIA, Y.; SHUM, F.; XU, H.; LI, B. M.; KAANG, B. K.; ZHUO, M. Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. **Neuron**, v. 47, p. 859–872, 2005.