RICARDO GABRIEL OLIVEIRA MAIA

Análise eletrofisiológica multi-unitária da matéria cinzenta periaquedutal dorsal e camadas intermediárias e profundas do colículo superior de ratos durante ameaça predatória

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2018

RICARDO GABRIEL OLIVEIRA MAIA

Análise eletrofisiológica multi-unitária da matéria cinzenta periaquedutal dorsal e camadas intermediárias e profundas do colículo superior de ratos durante ameaça predatória

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Newton Sabino Canteras

Versão Original

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Maia, Ricardo Gabriel Oliveira
Análise eletrofisiológica multi-unitária da matéria cinzenta periaquedutal dorsal e camadas intermediárias e profundas do colículo superior de ratos durante ameaça predatória / Ricardo Gabriel Oliveira Maia; orientador Newton Sabino Canteras. -- São Paulo, 2018.
98 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Neurobiologia. 2. Eletrofisiologia. 3. Matéria Cinzenta Periaquedutal. 4. Colículo Superior. 5. Medo. I. Canteras, Newton Sabino, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ricardo Gabriel Oliveira Maia

Título da Dissertação/Tese: Análise eletrofisiológica multi-unitária da matéria cinzenta periaquedutal dorsal e camadas intermediárias e profundas do colículo superior de ratos durante ameaça predatória.

Orientador: Prof. Dr. Newton Sabino Canteras

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

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

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

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

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

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

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.077.16

São Paulo, 22 de agosto de 2016.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "***Bases Neurais dos comportamentos motivados***", registrado sob o protocolo nº ***085/2012*** e aprovado em 24/08/2012 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 24/08/2020**.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	**Linhagem**	**Sexo**	**Idade/Peso**	**Quantidade por ano**
Rato	Wistar	Macho	60 dias	1º: 850 2º: 850 3º: 850 4º: 850
Rato	Long Evans	Macho	90 dias	1º: 20 2º: 20 3º: 20 4º: 20
Rato	Long Evans	Fêmea	90 dias	1º: 30 2º: 30 3º: 30 4º: 30

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador - CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Newton Sabino Canteras**
Departamento de **Anatomia**
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

ICBUSP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.008.2016

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 085/2012/CEUA, datado de 24/08/2012, e por solicitação do Prof. Dr. **Newton Sabino Canteras,** responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Ricardo Gabriel Oliveira Maia** ao Projeto de Pesquisa ***"Bases Neurais dos comportamentos motivados"***, uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 15 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador da CEUA-ICB/USP

RECEBI ORIGINAL
25/02/16

Dedicado a meu avô, Waldir,
que sempre comprou meus
gibis e com quem joguei
muitos jogos de damas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, Sabrina Imbrosio Oliveira, sem a qual seria impossível ter vindo a São Paulo para realizar meu curso de ensino superior. Ela quem financiou minha formação, do começo ao fim, e quem me deu todo o apoio necessário para continuar estudando até atingir meus objetivos, pelo tempo que fosse necessário.

Agradeço a meu orientador, Prof. Dr. Newton Sabino Canteras, que acreditou na minha capacidade de ver esse trabalho realizado até o fim, mesmo que em inúmeros momentos eu mesmo tenha vacilado.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcus Vinícius Baldo, que pacientemente escutou e me guiou nas análises estatísticas desse trabalho, indicando como apresentar meus dados da melhor maneira e quais modificações deveriam ser feitas.

Agradeço a meus colegas do Laboratório de Neuroanatomia Funcional, particularmente ao Ricardo Bindi, quem me ensinou todas as técnicas necessárias para realização desse trabalho e o desenvolveu em conjunto comigo, ao Miguel Xavier, que me ajudou na preparação de algumas figuras deste trabalho, e ao Fernando Reis, com quem tive muitas conversas instrutivas sobre como manter minha postura científica.

Agradeço a todos os meus amigos, minha família e a minha namorada Graziely, que me deram todo o apoio para seguir com a carreira científica, sem nunca duvidarem de minhas chances de ter sucesso nessa empreitada.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que financiou este trabalho durante o período de março de 2017 até a sua conclusão (número do processo: 131034/2017-0).

“The oldest and strongest emotion of mankind is fear, and the oldest and strongest kind of fear is fear of the unknown”

(LOVECRAFT, 1927, p. 27)

RESUMO

MAIA, R. G. O. **Análise eletrofisiológica multi-unitária da matéria cinzenta periaquedutal dorsal e camadas intermediárias e profundas do colículo superior de ratos durante ameaça predatória**. 2018. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A circuitaria neuro-anatômica envolvida com a organização de respostas de medo inclui muitos sítios subcorticais diferentes, dois dos quais são a região dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (dPAG) e as camadas intermediárias e profundas do colículo superior (i/dlSC). Este estudo investigou como as células destas duas regiões mudam de atividade em um rato que foi colocado diante de seu predador, o gato, comparado com outras situações onde o risco menor. 11 ratos wistar machos passaram por cirurgia para implantação de um microdriver contendo 8 tetrodos, que detectou 39 células na dPAG de 7 ratos e 44 células nas i/dlSC de 4 ratos. A atividade das células foi registrada em uma condição de base e em quatro condições experimentais distintas: o rato confinado, o rato diante de uma novidade, diante de um predador e diante do contexto predatório. Os dados coletados foram analisados por scripts de MATLAB e cada célula foi classificada para sua responsividade às condições experimentais, à mudança do comportamento do rato, à velocidade e à posição do rato no aparato. Na dPAG as células se mostraram mais responsivas a condição do gato do que as demais condições experimentais, tanto em número de células como em aumento de atividade celular. Uma quantidade menor de células mostrou-se responsiva a mudanças de comportamento, particularmente os comportamentos de defesa. Nas i/dlSC as células também se mostraram mais responsivas para o gato, seguido do contexto, em ambos os casos com diminuição de atividade celular, que foi mais intensa no gato. Uma quantidade menor de células pareceu responder de forma similar para as diferentes mudanças comportamentais. Interpretamos esses dados propondo que a dPAG possui uma função sinalizadora de medo, fortemente ativada durante o gato, e que as i/dlSC são inibidas diante do gato a fim de evitar a captação de estímulos irrelevantes para lidar com a situação de risco.

Palavras-chave: Neurobiologia. Eletrofisiologia. Matéria Cinzenta Periaquedutal. Colículo Superior. Medo.

ABSTRACT

MAIA, R. G. O. **Multi-unitary electrophysiological analysis of the dorsal periaqueductal gray and the intermediate and deep layers of the superior colliculus of rats during predatory threat**. 2018. 98 p. Dissertation (Master thesis in Morphofunctional Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The neuroanatomical circuitry involved with the organization of fear responses includes a great number of subcortical sites, two of which are the dorsal periaqueductal gray (dPAG) and the intermediate and deep layers of the superior colliculus (i/dlSC). This study investigated how the cellular activity in these regions changed in a rat that was exposed to one of its predators, a cat, when compared with lower risk situations. 11 male wistar rats underwent surgery to implant a microdriver containing 8 tetrodes, which detected 39 cells in the dPAG of 7 rats and 44 cells in the i/dlSC of 4 rats. Cell activity was registered in a basal condition and then again in for experimental conditions: the rat confined in a smaller space, the rat facing a novel stimulus, the rat facing a cat and the rat facing the predatory context. Collected data was analyzed using MATLAB and each cell was classified according to its responsivity to the experimental conditions, to the rats' switches in behavior, to the rats' speed and position in the experimental apparatus. In the dPAG, cells were shown to be more responsive to the cat condition over the other conditions, both in terms of number of responsive cells and intensity of increase in firing activity. A smaller number of cells were responsive to behavior switching, being especially sensitive to the initiation of defensive behaviors. In the i/dlSC, cells were more responsive to the cat, followed by the predatory context, in both cases with a general reduction of cellular activity that was more intensive for the cat. A smaller number of cells was responsive in similar ways for behavior switching across experimental conditions. We interpret this data by proposing that the dPAG acts signaling a state of fear, particularly during a high risk situation, and the i/dlSC are inhibited during riskier situations so as to block irrelevant environmental stimuli.

Keywords: Neurobiology. Electrophysiology. Periaqueductal Gray. Superior Colliculus. Fear.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática do circuito neuroanatômico de medo para predadores.....32
Figura 2: Representação esquemática de cortes coronais mostrando diferentes níveis da PAG.....35
Fotografia 1: Tetrodo confeccionado.....39
Fotografia 2: Microdriver de 32 canais pré-confeccionado.....40
Figura 3: Aparato experimental com diferentes compartimentos nomeados.....43
Quadro 1: Divisão do protocolo experimental.....46
Figura 4: Exemplo de análise dos dados de uma célula a fim de determinar sua resposta frente a condição do gato.....49
Figura 5: Exemplo de análise dos dados de uma célula a fim de determinar sua resposta frente a mudança de um comportamento A para outro comportamento B durante a condição do gato.....51
Figura 6: Localização da ponta dos tetrodos identificados a partir da técnica de Nissl.....53
Figura 7: Gráfico de barras mostrando valor estimado do Efeito da Condição na dPAG e nas i/dlSC, para células com aumento e diminuição de atividade.....59
Figura 8: Gráfico de barras mostrando o tempo de expressão dos comportamentos em porcentagem, na dPAG e nas i/dlSC.....62
Quadro 2: Células da dPAG e das i/dLSC responsivas a comportamento.....64
Figura 9: Tipos de transições comportamentais por condição.....66
Figura 10: Característica da alteração de atividade celular para TCUMs.....68
Figura 11: Exemplos de peri-histogramas de células responsivas a TCUMs.....69
Figura 12: Gráficos de correlação entre posição e velocidade dos animais com a atividade de quatro células distintas.....73
Figura 13: Variação média da atividade de cada célula da dPAG e das i/dlSC por condição.....97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características de resposta da dPAG e das i/dlSC para as condições experimentais.....57
Tabela 2: Chance de duas condições experimentais interagirem.....61
Tabela 3: Correlações entre atividade celular e posição do animal no aparato.....71
Tabela 4: Correlações entre atividade celular e velocidade do animal no aparato...72
Tabela 5: Chance de duas características celulares interagirem na Parte 4 do protocolo.....74
Tabela 6: Chance de duas características celulares interagirem na Parte 5 do protocolo.....75

LISTA DE SIGLAS

AHN - Núcleo anterior do hipotálamo
AOB - Bulbo olfativo acessório
CeA - Amígdala central
CoA - Amígdala cortical
csc - Comissura do colículo superior
dlPAG - Coluna dorsal da matéria cinzenta periaquedutal
dmPAG - Coluna medial da matéria cinzenta periaquedutal
dmVMH - Região dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo
dPAG - Região dorsal da matéria cinzenta periaquedutal
i/dlSC - Camadas intermediárias e profundas do colículo superior
LA - Amígdala lateral
LP - Núcleo lateral posterior do tálamo
lPAG - Coluna lateral da matéria cinzenta periaquedutal
MeA - Amígdala medial
MOB - Bulbo olfativo principal
MOE - Epitélio olfativo principal
PAG - Matéria cinzenta periaquedutal
pBMA - Região posterior do núcleo basomedial da amígdala
pdMeA - Região posterior dorsal do núcleo medial da amígdala
PMd - Núcleo pré-mamilar dorsal
pvMeA - Região posterior ventral do núcleo medial da amígdala
SC - Colículo superior
slSC - Camada superficial do colículo superior
TCU - Transição comportamental única
TCUM - Transição comportamental única média
vlPAG - Coluna ventrolateral da matéria cinzenta periaquedutal
VNO - Órgão vomeronasal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 27
1.1 Predação, defesa e medo 27
1.2 Circuito do medo 28
1.3 A matéria cinzenta periaquedutal (PAG) 32
1.4 O colículo superior (SC) 36

2 MATERIAIS E MÉTODOS 39
2.1 Montagem dos microdrivers 39
2.2 Animais 40
2.3 Cirurgia estereotáxica 41
2.4 Recuperação da cirurgia 41
2.5 Sistemas de coleta de dados 42
2.6 Protocolo experimental 43
2.6.1 Parte 1 – registro da atividade celular basal 44
2.6.2 Parte 2 – efeito do confinamento 44
2.6.3 Parte 3 – efeito da novidade 44
2.6.4 Parte 4 – efeito do gato 45
2.6.5 Parte 5 – efeito do contexto predatório 45
2.7 Perfusão e histologia 45
2.8 Análise de dados comportamentais 46
2.9 Análise de dados eletrofisiológicos 47
2.10 Análise estatística dos dados 47
2.10.1 Análise por condição do protocolo experimental 48
2.10.2 Análise por comportamento realizado pelo animal 48
2.10.3 Análise da correlação da atividade celular com posição e velocidade 50

3 RESULTADOS 53
3.1 Lâminas histológicas 53
3.2 Análise da atividade celular 54
3.2.1 Atividade celular vs. condição experimental 55
3.2.2 Atividade celular vs. comportamento 61
3.2.3 Atividade celular vs. posição e velocidade 70

4 DISCUSSÃO 77
4.1 Região dorsal da Matéria Cinzenta Periaquedutal (dPAG) 77
4.2 Camadas intermediárias e profundas do Colículo Superior (i/dlSC) 83

5 CONCLUSÃO 87

REFERÊNCIAS 89

APÊNDICE A – *Heat map* da variação da atividade celular por condição 97

1 INTRODUÇÃO

1.1 Predação, defesa e medo

O surgimento de seres vivos que matam outros seres vivos a fim de satisfazer necessidades nutricionais (i.e., predadores) é, provavelmente, um dos eventos mais importantes da história da vida na terra. Teorias que buscam explicar a ocorrência de grandes transições na árvore da vida (procarioto para eucarioto, unicelular para multicelular, assexuados para sexuados, tecidos moles para tecidos duros) todas contam com a introdução de predadores como um fator explicativo decisivo (BENGTSON, 2002). Predadores possuem um grande impacto a nível ecossistêmico, aumentando a diversidade de espécies em um ambiente após sua introdução (HUNTLEY; KOWALEWSKI, 2007; SALEEM et al., 2012), e também um grande impacto a nível evolutivo, gerando forte pressão seletiva para adaptação de suas presas (DAWKINS; KREBS, 1979).

Em se tratando do aspecto evolutivo da predação, centenas de milhares de anos de interações predador-presa resultaram em uma variedade infindável de adaptações anti-predatórias, que vão desde o uso de coloração críptica para evitar detecção (COURNOYER; COHEN, 2011) até a emissão de fluidos corporais para evitar captura (ZINTZEN et al., 2011). O bom uso e aplicação dessas defesas anti-predatórias, no entanto, deve ser modulado por decisões comportamentais (LIMA; DILL, 1990). A presa deve tanto ser capaz de (i) avaliar quais seus riscos atuais de predação de momento a momento, como também (ii) decidir qual a melhor rota de ação a ser tomada após a detecção ou contato com um predador. O conjunto de respostas selecionadas evolutivamente para realizar (i) e (ii) são chamadas de **comportamentos de defesa**, que são padrões de ação estereotípicos acionados quando o organismo se encontra diante de um predador ou algum outro tipo de ameaça (BLANCHARD; BLANCHARD, 2008).

Sabe-se que os comportamentos de defesa são sensíveis a diferentes características de uma dada ameaça, incluindo a ameaça predatória. Estudos com vertebrados indicam que alguns animais são capazes de distinguir entre tipos de predadores (ave de rapina, mamífero carnívoro, cobra), sua localização (vindo de uma árvore ou do chão), e a sua proximidade (distante, próximo, muito próximo) (MANSER; SEYFARTH; CHENEY, 2002; CÄSAR et al., 2013). Essas e outras informações

devem ser tomadas em conjunto para que a presa organize a resposta comportamental – por exemplo, camundongos que reconhecem uma ameaça aérea podem fugir, se a ameaça parece estar caindo sobre eles, ou permanecer completamente imóveis, se a ameaça parece apenas estar passando por cima deles (DE FRANCESCHI et al., 2016). De fato, tamanha é a importância evolutiva de reconhecer e reagir a predadores que um estado emocional particular está associado a essa situação de insegurança. Tal estado emocional é conhecido simplesmente como **medo** (BOISSY, 1995).

O medo, como estado emocional, pode ser identificado em animais não-humanos pelo conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas que ele invoca, incluindo aqui os comportamentos de defesa (GROSS; CANTERAS, 2012). Desse modo, é possível estudar a formação do medo em suas etapas pela exposição de animais-modelo ao seu predador natural. Este é o tipo de trabalho que nosso laboratório realiza, com enfoque na descrição neuroanatômica do fenômeno – isto é, nosso interesse é compreender o papel de diversos sítios cerebrais na organização das respostas associadas ao medo, desde a identificação da ameaça predatória até a produção dos comportamentos de defesa adequados.

De modo a entender onde o presente trabalho se encaixa nesse contexto de estudo é interessante, primeiro, revisar o que já sabemos sobre a circuitaria neuroanatômica envolvida com a organização desse estado emocional e as respostas relacionadas. A menos que especificado o contrário, as descrições apresentadas a seguir serão produtos principalmente de trabalhos que envolvem ratos e camundongos como modelos de estudo.

1.2 Circuito do medo

Para que os comportamentos de defesa sejam organizados, é fundamental que a ameaça seja detectada. No caso da ameaça predatória, esse processo começa a partir de sítios neuroanatômicos responsáveis pela interpretação de pistas ambientais, principalmente pistas visuais e olfativas, prosseguindo para sítios de processamento e integração dessas informações, até atingir áreas que organizem respostas comportamentais (GROSS; CANTERAS, 2012; SILVA; GROSS; GRAFF, 2016). Ficará claro na descrição a seguir que, após o processamento inicial dos sinais sensoriais, danos em qualquer região subsequente envolvida neste circuito parecem

abolir ou diminuir as repostas de defesa a nível comportamental e fisiológico, indicando que a preservação desses sítios neurais é condição necessária para a geração destas respostas em condições naturais. A **Figura 1** contêm uma organização esquemática do circuito de defesa, que será descrito de maneira mais detalhada a seguir.

As pistas olfativas são moléculas químicas liberadas pelo predador que a presa é capaz de identificar devido a sua memória genética evolutivamente determinada, de modo que mesmo animais nunca expostos a predadores reagem aversivamente a essas moléculas (FUSTER, 1997; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001). As pistas olfativas são detectadas principalmente pelo epitélio olfativo principal (MOE) e pelo órgão vomeronasal (VNO), um epitélio especializado quimiossensível de vertebrados terrestres (PAPES; LOGAN; STOWERS, 2010; CHOI et al., 2016). O VNO lança projeções para o bulbo olfativo acessório (AOB), enquanto o MOE se projeta para o bulbo olfativo principal (MOB), e cada uma dessas regiões, individualmente, já é suficiente para produzir respostas aversivas ao odor de um predador (MASINI et al., 2010). Finalmente, parte das projeções do AOB e do MOB convergem para processamento em um dos principais sítios cerebrais envolvidos na geração de medo, a **amígdala**, mais especificamente, a amígdala medial (MeA) no caso do AOB, e a amígdala cortical (CoA) no caso do MOB (SCALIA; WINANS, 1975; KANG; BAUM; CHERRY, 2009). Como a MeA recebe projeções da CoA (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON,1995), é possível dizer que a integração das pistas olfativas do predador é feita principalmente na MeA.

Pistas visuais, por sua vez, são características particulares do estímulo visual que possam indicar uma ameaça predatória, como a forma do estímulo, a presença ou ausência de movimento e a direção em que o estímulo se move (BARRET, 2015). Em termos do processamento neural dessas pistas visuais de alto valor adaptativo, ainda não está claro se existe um caminho preferencial para a transmissão dessa informação ou múltiplos caminhos paralelos. Wei et al. (2015) descreveram um trajeto subcortical em que os sinais captados pela retina são transmitidos para o colículo superior (SC), daí para o núcleo lateral posterior do tálamo (LP) e, finalmente, para a amígdala lateral (LA). Em contrapartida, Pessoa e Adolphs (2010) enfatizam o papel do córtex no processamento dessas pistas visuais, em particular do córtex visual, propondo um modelo que envolve alças neuroanatômicas formadas entre o tálamo e o córtex, e que inclui a amígdala como um dos sítios finais de recebimento dos sinais

processados. Independente do modelo adotado, o papel da amígdala como um sítio de convergência das informações visuais afetivas é bem delineado.

Após a detecção das diferentes pistas ambientais pelos órgãos e circuitos perceptivos, a organização da resposta de medo continua na amígdala. Este sítio cerebral é, na verdade, composto por uma combinação de diferentes núcleos celulares presentes no córtex e no corpo estriado – como as já citadas MeA, CoA e LA – cada um com diferentes conexões e características anatômicas (SWANSON; PETROVICH, 1998). O papel da amígdala na formação das respostas do medo é conhecido já há algum tempo, tendo iniciado com estudos pioneiros da remoção do lobo temporal em macacos rhesus. Os macacos perdiam as respostas de medo inato e exploravam todo o ambiente ao seu redor avidamente, incluindo até mesmo a língua de uma cobra sibilante (KLÜVER; BUCY, 1939). Estudos posteriores demonstraram mais claramente o papel da amígdala na produção do medo: ratos com lesões na amígdala medial (MeA), lateral (LA) ou região posterior da amígdala basomedial (pBMA) manifestam significativamente menos vezes seus comportamentos de defesa quando colocados diante de um predador (MARTINEZ et al., 2011); lesões na amígdala central (CeA) impedem a expressão de medo a uma pista previamente associada a um estímulo doloroso (ZIMMERMAN et al., 2007); e a paciente S.M. (uma mulher com lesão amigdalar bilateral), quando comparada a controles, demonstrou quase completa ausência de respostas de medo durante uma visita a uma casa de espanto, durante exposição direta a aranhas e cobras, e ao assistir dez filmes de terror diferentes (FEINSTEIN et al., 2011).

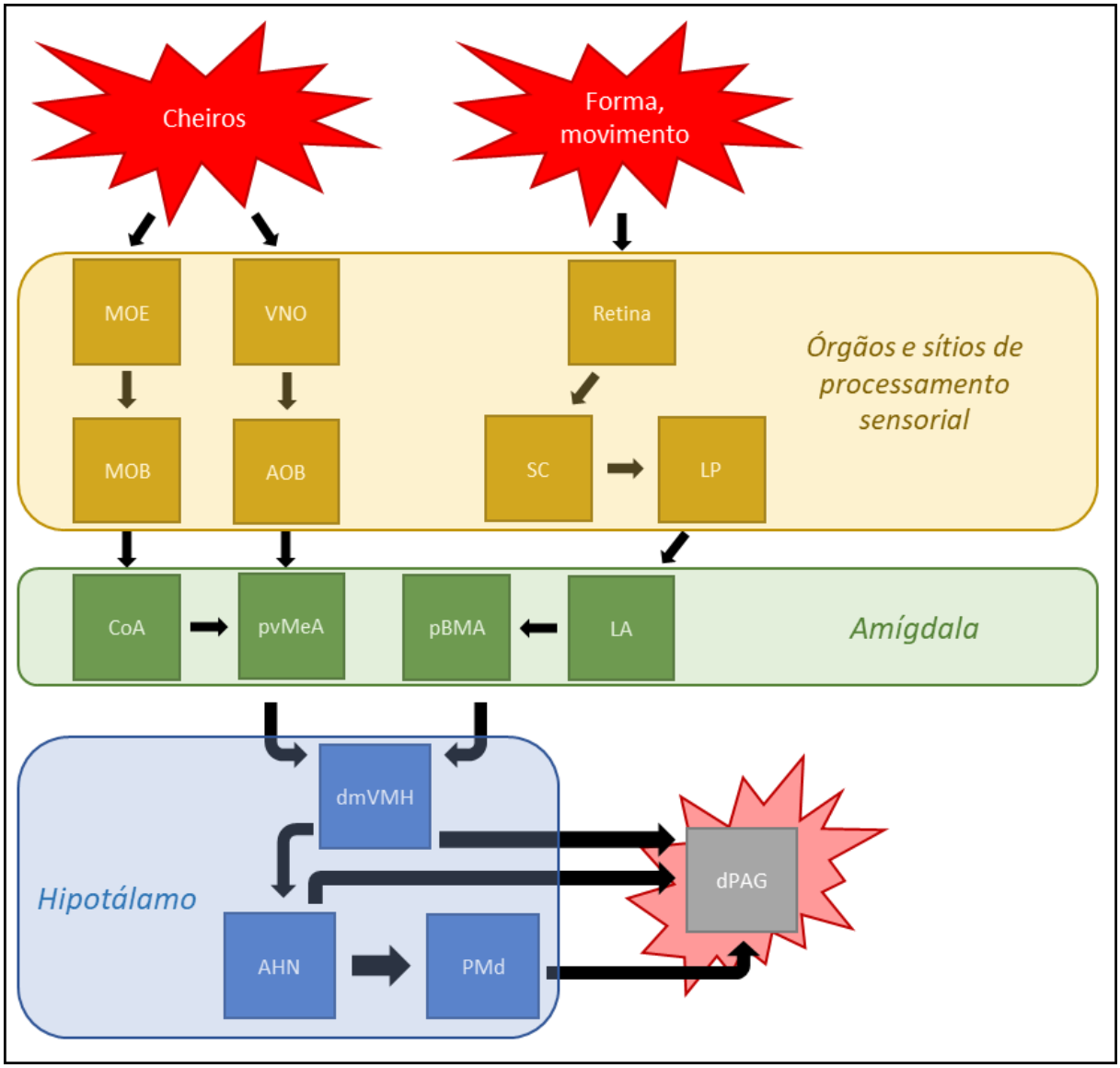
Mais recentemente, a literatura científica vem apreciando o fato de que diferentes núcleos amigdalares coordenam a geração de medo a diferentes tipos de ameaça. Lesões na CeA não inibem respostas a um predador ou a um ambiente associado com a presença de um predador, apesar de inibirem respostas a pistas associadas com estímulos dolorosos (MARTINEZ et al., 2011). Em um nível anatômico ainda mais refinado, diferentes regiões da MeA parecem lidar com diferentes tipos de ameaça. A região posterior ventral da MeA (pvMeA) está envolvida com o circuito de medo ao predador, enquanto a região posterior dorsal (pdMeA) está envolvida com o circuito de medo a ameaças coespecíficas (GROSS; CANTERAS, 2012). Esta última diferenciação se torna mais clara no próximo sítio anatômico envolvido no circuito do medo – e o próximo a ser discutido aqui – o hipotálamo.

Os diferentes núcleos da amígdala que receberam sinais dos órgãos sensoriais continuam a organizar a resposta de medo projetando-se para o hipotálamo. Foram identificados dois circuitos distintos dentro do hipotálamo que lidam cada um com a organização de respostas de medo para um tipo de ameaça: o circuito de resposta a coespecíficos, que recebe projeções da pdMeA e não será discutido nesse trabalho; e o circuito de resposta a predadores, que consiste na região dorsomedial do núcleo hipotalâmico ventromedial (dmVMH), o núcleo hipotalâmico anterior (AHN) e o núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) (CEZARIO et al., 2008). Neste circuito, é o dmVMH quem recebe a maior parte das projeções vindas dos diferentes núcleos da amígdala, incluindo informações de caráter olfativo transmitidos pela pvMEA e informações de caráter visual supostamente transmitidas pela pBMA (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; PETROVICH; RISOLD; SWANSON, 1996).

Apesar do dmVMH ser o alvo principal dos sinais vindos da amígdala, os outros dois núcleos hipotalâmicos mencionados – AHN e PMd – mostraram-se também importantes para a geração de medo ao predador. O AHN recebe projeções do dmVMH e envia projeções para o PMd, de modo que estes núcleos estão todos altamente conectados (RISOLD; CANTERAS; SWANSON, 1994; GROSS; CANTERAS, 2012; WANG; CHEN; LIN, 2015). Cada um destes núcleos se mostrou envolvido com a organização das respostas de medo, de forma coletiva e individual: todos os três núcleos apresentaram maior expressão de uma proteína marcadora de atividade neuronal (c-fos) logo após exposição ao predador (CEZARIO et al., 2008); estimulação optogenética do trato dmVMH-AHN, assim como estimulação somente do AHN, leva a manifestação de comportamentos defensivos (WANG; CHEN; LIN, 2015); e lesões no PMd levam a perda da apresentação de comportamentos defensivos e aumento de comportamentos exploratórios (CANTERAS et al., 1997; CEZARIO et al., 2008).

Finalmente, os diferentes núcleos do circuito hipotalâmico de medo ao predador convergem em um sítio do tronco encefálico, a região dorsal da **matéria cinzenta periaquedutal** (dPAG). O dmVMH, o AHN e o PMd todos enviam projeções diretas para a dPAG, já indicando a grande importância deste sítio para a manifestação de comportamentos defensivos e geração do medo (CANTERAS; SWANSON, 1992; CANTERAS et al., 1997; WANG; CHEN; LIN, 2015). De fato, o estudo da dPAG é o objetivo principal do presente trabalho, e a importância deste sítio no estudo neuroanatômico funcional do medo será discutido em detalhes na seção a seguir.

Figura 1 – Representação esquemática do circuito neuroanatômico de medo para predadores



AHN: núcleo anterior do hipotálamo; AOB: bulbo olfativo acessório; CoA: amígdala cortical; dmVMH: região dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo; dPAG: região dorsal da matéria cinzenta periaquedutal; LA: amígdala lateral; LP: núcleo lateral posterior do tálamo; MeA: amígdala medial; MOB: bulbo olfativo principal; MOE: epitélio olfativo principal; pBMA: região posterior do núcleo basomedial da amígdala; PMd: núcleo pré-mamilar dorsal; pvMeA: região posterior ventral do núcleo medial da amígdala; SC: colículo superior; VNO: órgão vomeronasal. Fonte: o autor (2018).

1.3 A matéria cinzenta periaquedutal (PAG)

A matéria cinzenta periaquedutal é formada por um conjunto de neurônios que circundam o aqueduto cerebral a nível do mesencéfalo, formando uma importante interface funcional entre o prosencéfalo e regiões inferiores do tronco cerebral. De fato, a PAG recebe conexões de múltiplas regiões do prosencéfalo (i.e., o córtex pré-frontal medial e o anterior cingulado, o núcleo central da amígdala e diversos núcleos

hipotalâmicos) e envia projeções para diversos núcleos do tronco cerebral (i.e., o *locus coeruleus* e as regiões rostral e caudal da medula ventrolateral). Além dessas conexões, a PAG também envia projeções de volta para regiões do prosencéfalo, incluindo a amígdala, e recebe conexões do tronco cerebral (BENARROCH, 2012; WATSON; KIRKCALDIE; PAXINOS, 2010).

O papel da PAG na organização de respostas do medo começou a ficar claro a partir de estudos de traçamento, de estimulação elétrica e de lesão eletrolítica na região. Por exemplo, Liebman, Mayer e Liebeskind (1970) demonstraram que ratos com lesões completas na PAG praticamente não suprimiam o comportamento exploratório logo após o recebimento de um choque nas patas, em contraste com controles que ficavam completamente parados. No que tange ao medo a estímulos mais naturais, Blanchard, Williams e Lee (1981) demonstraram que ratos selvagens com lesões na PAG praticamente perdiam todas as respostas defensivas a estímulos que deveriam ser considerados ameaçadores – como um humano ou coespecífico aproximando-se do animal, ou contato táctil nas costas ou vibrissas. Acrescentando a essas evidências de estudos com animais, humanos que receberam estimulação elétrica nessa região manifestaram uma clara reação de medo acompanhada pela descrição de que “algo horrível estava para acontecer”, ou que “alguém os estava perseguindo” (AMANO et al., 1982).

Como foi discutido na seção anterior, os diferentes núcleos da amígdala e do hipotálamo parecem ser necessários para a construção da resposta de medo, dado que danos nesses núcleos inibem comportamentos defensivos (CANTERAS et al., 1997; MARTINEZ et al., 2011). Entretanto, estudos vem demonstrando já há algum tempo que a ação desses núcleos amigdalares e hipotalâmicos na geração de medo é, provavelmente, resultado de suas projeções para a PAG. Por exemplo, um estudo com gatos demonstrou que estimulação elétrica da PAG enquanto o hipotálamo estava lesionado era o suficiente para evocar respostas de medo, enquanto o reverso não era o caso (SKULTETY, 1963). Outro estudo com ratos que tiveram o telencéfalo removido (o que incluiu grande porção da amígdala) mostrou que estimulação química da PAG também era o suficiente para evocar respostas de medo (TOMAZ et al., 1987). Ou seja, enquanto danos na PAG inibem respostas defensivas, estimulações da PAG são o suficiente para produzir tais respostas mesmo que os outros núcleos do circuito do medo (amígdala e hipotálamo) estejam danificados. Esse conjunto de estudos indica que a PAG é um sítio neuroanatômico **necessário e suficiente** para a geração

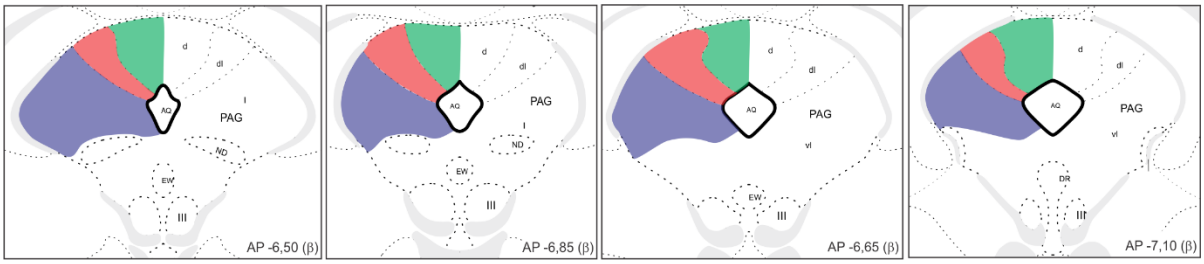
do estado de medo. No entanto, acredita-se que pelo menos parte do efeito da PAG na geração de respostas de defesa dependa de projeções ascendentes. Isto foi mostrado no estudo realizado por Kim et al. (2013) em que danos na amígdala basolateral impedem a formação de respostas de medo geradas por estimulação da PAG em ratos forrageando.

Adicionalmente, no começo da década de 90, a PAG começou a ser reconhecida como uma estrutura não homogênea, organizada longitudinalmente em quatro colunas: dorsomedial (dmPAG), dorsolateral (dlPAG), lateral (lPAG) e ventrolateral (vlPAG) (CARRIVE, 1993; BANDLER; SHIPLEY, 1994), como demonstrado na **Figura 2**. É importante ressaltar que essa descoberta foi feita não só com base em diferenças anatômicas e histoquímicas, mas também diferenças funcionais. Por exemplo, estimulações na lPAG produziam respostas de fuga, enquanto estimulações na vlPAG produziam respostas de congelamento motor (BANDLER; SHIPLEY, 1994). A partir dessas observações, novos estudos indicaram que as diferentes colunas da PAG estariam associadas com respostas a diferentes tipos de ameaça – expor ratos ao odor de um predador ou ao próprio predador ativa marcadamente células da região dorsal da PAG (dPAG), que incluiu tanto dlPAG como dmPAG (CEZARIO et al., 2008; SUKIKARA et al., 2010), enquanto que lesões nesta mesma região inibem respostas de medo induzidas pelo predador (RUFINO, 2015). De maneira similar, lesões na região ventral da PAG inibem respostas de medo a um contexto previamente associado com uma experiência dolorosa, como choque nas patas (VIANNA et al., 2001a). Em função desses e de outros resultados, Gross e Canteras (2012) propuseram que a dPAG estaria associada com medo a predadores e coespecíficos, enquanto a região ventrolateral estaria associada a medo de estímulos dolorosos, ressaltando que o medo em animais não-humanos é observado através da apresentação dos comportamentos de defesa.

A dPAG é o foco deste trabalho justamente por seu papel como importante centro de resposta do medo ao predador, recebendo projeções dos diversos núcleos hipotalâmicos previamente citados (o AHN, dmVMH e PMd). Uma importante questão que emergiu com os estudos da dPAG é se, devido a sua posição anatômica estratégica no tronco cerebral, este sítio neuroanatômico coordenava diretamente a formação dos comportamentos defensivos. Cezario et al. (2008) verificaram histologicamente que (i) ratos expostos a um ambiente onde encontraram um predador apresentavam maior atividade celular na dPAG e expressavam o

comportamento defensivo de **avaliação de risco**, e (ii) ratos em contato com o predador apresentavam atividade celular na dPAG ainda maior que em (i), e isso estava associado com o comportamento defensivo de **congelamento**. Bittencourt et al. (2004), por sua vez, associaram diferentes níveis de ativação elétrica da dPAG com a apresentação de uma hierarquia de respostas de medo, descritas da menor ativação para a maior: protrusão dos globos oculares, congelamento motor e, finalmente, comportamentos de fuga.

Figura 2 – Representação esquemática de cortes coronais mostrando diferentes níveis da PAG



A coordenada antero-posterior (AP) está indicada a partir do bregma (β). Verde: dmPAG; vermelho: dlPAG; azul: lPAG. AQ: aqueduto cerebral; DR: núcleo dorsal da raphe; EW: núcleo Edinger-Westphal; dm/dl/l/vl PAG: matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial, dorsolateral, lateral, ventrolateral, respectivamente. Modificado de Swanson (2004).

Devido a esses e outros resultados da literatura, este projeto buscou investigar se havia uma correlação direta entre mudança de atividade celular e apresentação de comportamento de defesa apresentado na região dorsal da PAG. Para isso utilizamos a técnica de **registro extracelular multi-unitário**, que permite verificar a atividade celular simultânea de múltiplos neurônios em uma dada região, em tempo real, enquanto o animal atua livremente (BUZSÁKI, 2004). Quando o animal sendo registrado é colocado diante de um novo estímulo ou produz algum comportamento, esta técnica permite observar correlações entre a apresentação desse estímulo ou comportamento com a atividade celular de grupos de neurônios.

No começo da obtenção de registros da dPAG, foram também registradas algumas células das camadas intermediárias e profundas do colículo superior (i/dlSC) devido à proximidade anatômica entre estes sítios. A fim de aproveitar os dados obtidos nesses registros, decidimos criar um grupo de coleta também dessa região, além do grupo da dPAG. Com isso podemos comparar a atividade celular de duas áreas distintas do tronco cerebral diante de um paradigma de medo ao predador. Sendo assim, vale revisar brevemente o que se sabe na literatura sobre o colículo superior, e como ele pode estar envolvido com o circuito de medo ao predador.

1.4 O colículo superior (SC)

O colículo superior situa-se na região dorsal do mesencéfalo dos mamíferos, posicionado logo acima da PAG. Ele é composto de camadas laminares que podem ser subdivididas de maneira mais ampla em uma região superficial, intermediária e profunda com base em suas características celulares (MAY, 2006). Um aspecto importante do SC é a aparente divisão funcional entre suas camadas: a camada superficial (slSC) recebe projeções diretas da retina e do córtex visual, estando primariamente envolvida com a detecção de estímulos visuais; já as camadas intermediárias e profundas (i/dlSC) recebem projeções de diversas áreas, integrando múltiplas informações sensoriais, incluindo informações visuais, auditivas e somestésicas. Dentre as funções das i/dlSC, em particular, podemos citar movimentos de orientação a um estímulo visual e produção de comportamentos de defesa (DEAN; REDGRAVE; WESTBY, 1989; SPARKS; HARTWICH-YOUNG, 1989).

Descobertas mais recentes enfatizam o papel das i/dlSC como organizadoras das respostas de medo, como por exemplo o estudo de Bittencourt et al. (2005), em que as i/dlSC são estimuladas eletricamente levando a apresentação de comportamentos defensivos associados à fuga. De fato, na descrição do circuito do medo feita neste trabalho, o SC apareceu como um dos elementos que envia pistas visuais para a LA através de um núcleo talâmico, como proposto por Wei et al. (2015). Wei enfatiza que esse envio é feito a partir das i/dlSC, que presumivelmente receberam os sinais visuais da slSC a partir da retina (DOUBELL et al., 2003).

Notavelmente, Redgrave e Dean (1991) comentam que danos na PAG removem respostas de fuga induzidas por estimulação química do SC, e eles propõem que a PAG organizaria os comportamentos de defesa a partir de informações relacionadas a distância predatória transmitidas pelo SC. Esta ideia é desenvolvida por Fanselow (1994), que propõe que animais que reconhecem um predador distante respondem com a estratégia de congelamento motor, mas alteram essa estratégia para fuga ou luta após uma mudança no grau de proximidade em relação ao predador. Diferentes células do SC poderiam sinalizar esses diferentes graus de proximidade para a PAG.

Além da aferência vinda da camada superficial, as i/dlSC recebem projeções diretas do dmVMH e do PMd e enviam projeções diretas para a dPAG (CANTERAS; SWANSON, 1992; CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1994). Isto indica que, além

do papel das i/dlSC no processamento das informações visuais da ameaça predatória, estas camadas também processam as informações do circuito hipotalâmico responsivo ao predador. Dado todas essas informações acerca das i/dlSC no circuito do medo, é razoável esperar uma correlação entre a atividade elétrica destas camadas e a presença da ameaça predatória.

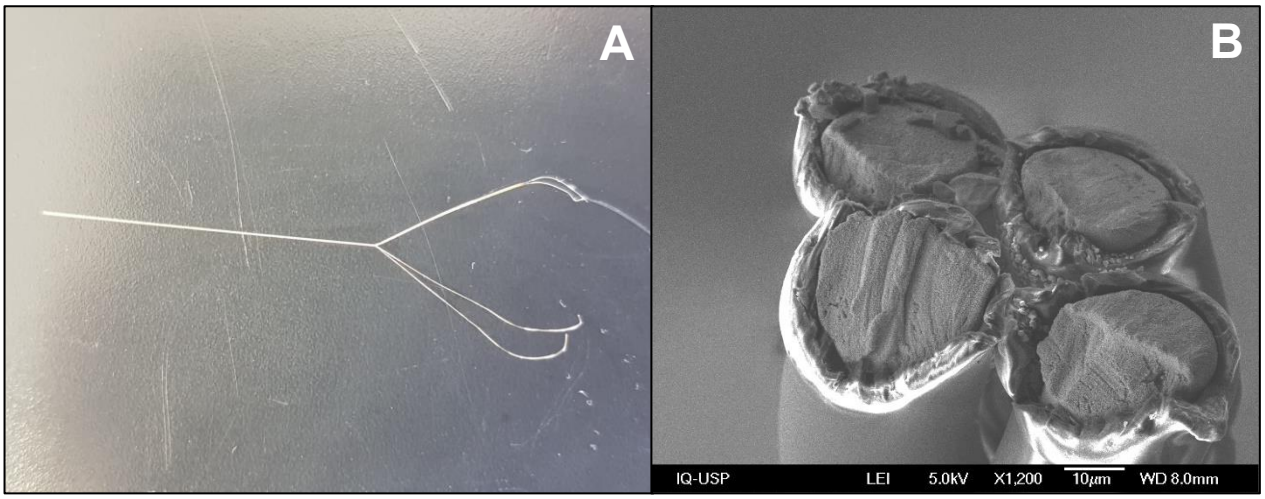
2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Montagem dos microdrivers

O microdriver é a estrutura que fecha o circuito entre os eletrodos e o sistema de captação de dados para registro da atividade celular. Os eletrodos são agrupados em conjuntos de quatro, chamados tetrodos, e é a ponta desses tetrodos que fica em contato com a região de interesse no encéfalo do animal. A outra extremidade dos tetrodos forma contato elétrico com o microdriver, fixado no crânio do animal através de cirurgia. O microdriver permite também regular a posição dos tetrodos no eixo dorso-ventral, facilitando a busca por células.

Para realizar a montagem dos microdrivers, é preciso primeiro realizar a montagem dos tetrodos. Os tetrodos são feitos a partir de um fio de 25 µm de diâmetro, constituído por 10% de irídio e 90% de platina (California Fine Wire Company, Grover Beach, CA-US). O fio é dobrado de modo a formar quatro pontas expostas, cada ponta sendo um eletrodo para captação de dados. A **Fotografia 1** mostra um exemplo de tetrodo.

Fotografia 1 – Tetrodo confeccionado

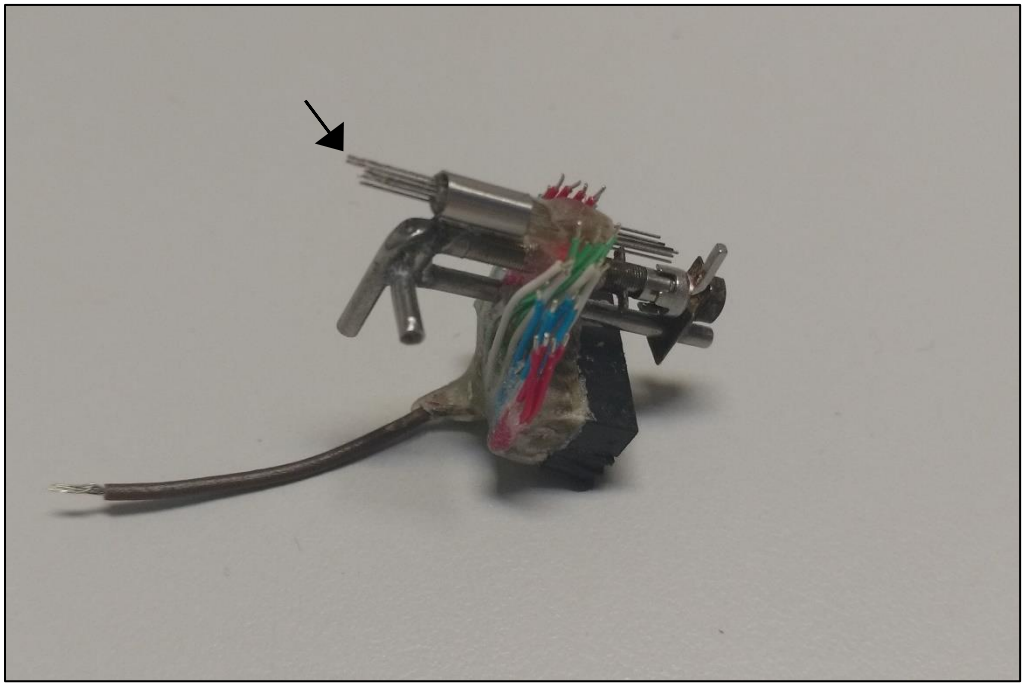


A. Foto de um tetrodo pronto para ser colocado em um microdriver. As quatro pontas expostas à esquerda da imagem serão amarradas ao microdriver, fechando o circuito. **B.** Foto de microscópio de varredura da extremidade de um tetrodo, onde é possível ver as quatro pontas dos eletrodos que ficarão em contato com o encéfalo. Fonte: o autor (2018), foto A; Gabriel Meloni (2017), foto B.

Na próxima etapa de confecção os tetrodos são conectados aos postes de contato do microdriver, e são isolados eletricamente. A conexão com os postes é o que fecha o circuito entre o encéfalo do animal, o microdriver e o sistema de aquisição

de dados. Para formar esta conexão, a camada isolante do fio é removida nessa região, os fios são enrolados ao redor dos postes e recebem uma camada de tinta condutora de prata (Electrolube, Ashby Park, Leicestershire-UK). Uma vez que a tinta condutora tenha secado, aplica-se esmalte de unhas para isolamento elétrico (Revlon, Rio de Janeiro, RJ-BR). A **Fotografia 2** mostra um microdriver em estado de pré-confecção, pronto para que os tetrodos sejam amarrados nos postes de contato.

Fotografia 2 – Microdriver de 32 canais pré-confeccionado



Os tetrodos serão colocados na posição em que estão as pequenas brocas de metal (indicado pela seta). As pontas expostas serão amarradas aos postes de contato, representados na figura pelos fios de cor verde, branco, azul e vermelho. Fio-terra em marrom. Fonte: o autor (2018).

2.2 Animais

Para aplicação do protocolo experimental foram utilizados 11 ratos wistar macho provenientes do Biotério Central do ICB – USP e mantidos até retirada para cirurgia no Biotério do Departamento de Anatomia do ICB – USP. Após a cirurgia os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neuroanatomia Funcional em gaiolas de acrílico, com condições estáveis de temperatura (~23°C), um ciclo claro/escuro invertido (12 horas), e livre acesso à água e ração. Os animais, quando no período de aplicação do protocolo experimental, tinham entre 3 a 6 meses de idade e pesavam de 315 a 450 gramas. Todos esses procedimentos foram realizados de

acordo com certificado aprovado pela CEUA ICB (número 085/2012) e normas estabelecidas pelo CONCEA.

2.3 Cirurgia estereotáxica

Todos os animais passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico para implante de microdriver de 32 canais, descrito a seguir. Antes da cirurgia, uma dose subcutânea de 0.3 ml de solução salina com Fastfen (Citrato de Sufentanila, Cristália, Itapira, SP-BR, 0,06 ml/ml) e Banamine (Flunixina Meglumina, Schering-Plough Santé Animale, Segré-em-Anjou Bleu-FR, 2,5µg/ml) foi administrada. Durante a cirurgia, os animais foram mantidos anestesiados com Isoforine (Isoflurano 100%, Cristália, Itapira, SP) através de um vaporizador (Harvard Apparatus, ST1 72-6420) que enviava um fluxo regular de anestésico. O nível de indução anestésica variava conforme a etapa da cirurgia, enquanto a gradação de oxigênio foi mantida constante a 3L/min.

As coordenadas cirúrgicas para atingir a região dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (dPAG) foram -6.3 mm em relação ao bregma no eixo antero-posterior e +/-2.2 mm no eixo latero-medial. Os oito tetrodos do microdriver de 32 canais foram implantados em ângulo de 20° em relação a um eixo perpendicular ao crânio do animal, e a coordenada dorso-ventral escolhida foi -3.9 mm (contando a partir do contato que os tetrodos faziam com a meninge do encéfalo). As mesmas coordenadas e angulação foram usadas para atingir as camadas intermediárias e profundas do colículo superior (i/dlSC). A diferença entre as regiões foi que, para atingir a dPAG, o microdriver era regulado pós-cirurgicamente no eixo dorso-ventralmente, descendo entre 300µm à 600µm, enquanto nas i/dlSC a posição inicial já era adequada. Cada microdriver foi fixado no crânio com auxílio de acrílico auto polimerizante (JET, Campo Limpo Paulista, SP) e 5 parafusos M1.6 x 3 com passo de 0,35 mm, dos quais, idealmente, apenas um ficava em contato com a meninge provendo aterramento.

Ao fim da cirurgia todos os animais passaram por um período de recuperação seguido da coleta de dados. Ao término da coleta os animais foram sacrificados, seguindo para perfusão intra-cardíaca, craniotomia e microtomia de congelamento. Todas essas etapas estão descritas a seguir.

2.4 Recuperação da cirurgia

Os animais ficaram em repouso e observação por um período de pelo menos uma semana após a cirurgia. Durante os cinco primeiros dias desse período os animais receberam a mesma solução diária de 0.3ml de salina com Fastfen e Banamine administrada pré-cirurgicamente. Também foi administrado intra-muscularmente um pentabiótico veterinário de pequeno porte (Benzilpenicilina Benzatina, Benzilpenicilina Procaína, Benzilpenicilina Potássica, Diidroestreptomicina Base, Estreptomicina Base, Eurofarma Laboratórios Ltda., São Paulo, SP, 0,1ml /100g) uma vez após a cirurgia e outra novamente quatro dias depois.

2.5 Sistemas de coleta de dados

Os dados eletrofisiológicos foram obtidos a partir do sistema de registro de canais Axona (Recording System, Axona), que transmite os dados de disparos celulares coletados pelo microdriver para um pré-amplificador de sinal e, em seguida, para um conversor do sinal analógico para digital. Esses dados foram enviados para um computador e interpretados com o auxílio do software DacqUSB v1.2.2.16. O limiar para considerar disparos no software foi de 50% do alcance máximo da voltagem, que variou entre 68µV e 100µV. A taxa de captura do software era de 24Khz, e a filtragem de banda foi feita para frequências entre 300 a 5000 Hz.

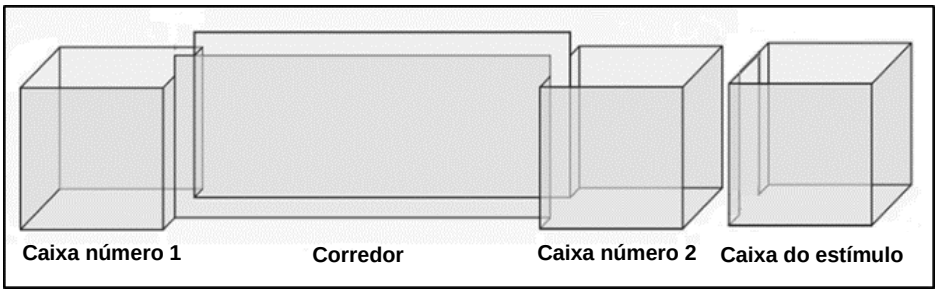
Adicionalmente, a posição do animal foi registrada com o auxílio de uma pequena lâmpada LED posicionada no cabo do sistema de captação de dados que se conectava ao microdriver. Uma câmera com visão superior do aparato registrava a localização do LED e enviava essa informação para o sistema de registro da Axona. Os dados comportamentais foram registrados por uma webcam posicionada diante do aparato (HD pro webcam C920, Logitech).

Após a recuperação da cirurgia os animais passam por um período de familiarização com o aparato experimental em que os dados de atividade celular foram coletados, mas não analisados para o experimento. Este período de familiarização variou de um mínimo de três seções no aparato experimental para até nove seções. A duração foi diferente para cada animal porque essas seções são utilizadas para ajuste dos parâmetros do software de coleta e para posicionamento dos tetrodos na coordenada dorso-ventral de interesse, que corresponde à posição da dPAG (-4.2mm a -4.5mm) ou das i/dlSC (-3.9mm). O protocolo experimental foi aplicado após a detecção de no mínimo três células, na profundidade de interesse.

2.6 Protocolo experimental

O protocolo experimental teve duração de 2 dias ao todo. Durante o protocolo, o animal foi colocado dentro do aparato experimental (altura: 50cm, largura: 12,5 a 30cm, comprimento: 150 cm), que consistia em duas caixas (número 1 e número 2) interligadas por um corredor, e um espaço adicional onde foram apresentados os estímulos para o animal dentro de **caixas do estímulo**. Um modelo deste aparato pode ser visto na **Figura 3**.

Figura 3 – Aparato experimental com diferentes compartimentos nomeados



Fonte: o autor (2018).

A caixa número 2 possui uma abertura (não representado na Figura 3) que se comunicava diretamente com o espaço externo. É neste espaço que foram colocadas as caixas do estímulo, que estariam vazias ou possuiriam algum estímulo específico dependendo da etapa do protocolo experimental. O rato podia tocar as caixas do estímulo por meio da abertura na caixa número 2, mas não podia acessar o interior dela. Adicionalmente, o rato podia ser confinado à caixa n° 2 com o uso de uma porta de acrílico opaca que bloqueava o acesso ao corredor.

O protocolo experimental foi separado em cinco partes em que o animal foi colocado em **cinco condições** distintas, sendo que a segunda e terceira condições foram desenvolvidas para testar efeitos que não correspondiam a uma resposta de medo. Todas as cinco partes foram aplicadas a cada animal e acontecem na ordem cronológica que será apresentada aqui. Dentro de cada parte do protocolo foram realizados dois registros de atividade celular em **intervalos de 10 minutos**. Entre estes intervalos o registro foi interrompido por um período de 2 a 3 minutos, de modo que o período total de gravação de atividade celular para cada parte do protocolo durou 20 minutos, mas descontinuamente. Na primeira, segunda e terceira parte do

protocolo, durante as interrupções de registro, o animal foi retirado e recolocado no aparato para estimular sua movimentação.

2.6.1 Parte 1 – registro da atividade celular basal

Cada uma das condições experimentais explicadas a seguir foi testada contra esta condição, o registro de atividade celular basal do animal. Neste registro, o rato tinha livre acesso ao aparato e a caixa do estímulo permaneceu vazia. Este registro durou 2 intervalos de 10 minutos, o mesmo período de tempo que as outras condições experimentais.

2.6.2 Parte 2 – efeito do confinamento

Esta parte do protocolo foi desenvolvida para verificar se havia alguma diferença significativa na atividade celular do animal quando ele estava confinado a uma pequena parte do aparato em contraste com o registro basal em que ele tinha livre acesso ao aparato. Neste registro, o rato ficou confinado à caixa n°2 do aparato e a caixa do estímulo permaneceu vazia.

2.6.3 Parte 3 – efeito da novidade

Esta parte do protocolo foi desenvolvida para verificar se havia alguma diferença significativa na atividade celular do animal quanto ele estava diante de um estímulo novo não ameaçador em contraste com a ausência de estímulos do registro basal. Neste registro, o rato tinha livre acesso ao aparato e a caixa do estímulo continha um estímulo visual neutro, representado por um macaco de pelúcia, e um estímulo odorífico neutro, composto de papel vegetal embebido em 1ml de essência de baunilha.

Ao fim desta parte do protocolo, a caixa do estímulo neutro foi removida da sala de experimentos e substituída por uma caixa limpa e vazia, idêntica à utilizada na primeira parte do protocolo. O animal foi mantido no aparato com livre acesso aos seus compartimentos por mais um período de 2 intervalos (20 minutos) na presença desta nova caixa. Isto foi feito a fim de distanciar a apresentação do estímulo neutro desta segunda parte com o estímulo ameaçador apresentado na terceira parte. A

partir deste ponto, o rato não foi mais manipulado pelo experimentador até o fim da aplicação do protocolo.

2.6.4 Parte 4 – efeito do gato

Nesta parte do experimento o animal foi apresentado ao estímulo ameaçador, o gato, ainda durante o primeiro dia do protocolo. Antes de iniciar o registro da atividade celular, o animal foi confinado na caixa n°2, logo diante do gato que estava dentro da caixa de estímulos. Isto foi feito de modo a garantir a percepção do estímulo predatório. O ratou permaneceu assim por um período de 2 intervalos (20 minutos) confinado diante do predador, quando então a porta da caixa n°2 foi aberta e sua resposta ao gato foi registrada. Neste registro, o rato tinha livre acesso ao aparato e o gato estava presente na caixa de estímulos. Ao fim desse registro, a caixa de estímulos do gato foi removida da sala de experimentos e substituída por uma caixa idêntica a utilizada na primeira parte do protocolo, limpa e vazia. O rato foi removido do aparato 20 minutos depois, de volta para sua gaiola de acrílico no biotério, marcando o fim do primeiro dia de experimentos.

2.6.5 Parte 5 – efeito do contexto predatório

No segundo dia do protocolo o animal foi recolocado no aparato na ausência de quaisquer estímulos, a fim de verificar sua reação ao ambiente em que ele encontrou o predador. Esta última situação foi chamada de apresentação do contexto predatório. Neste registro, o rato tinha livre acesso ao aparato e a caixa do estímulo permaneceu vazia.

É importante ressaltar que entre o primeiro e segundo dia do protocolo o aparato é cuidadosamente limpo com álcool 70% de modo a remover quaisquer traços do odor do gato. A caixa de estímulos utilizada durante o contexto predatório era idêntica à caixa usada na primeira parte do protocolo. Todas essas etapas do protocolo discutidas aqui estão sintetizadas no **Quadro 1**.

2.7 Perfusão e histologia

Após a conclusão do protocolo experimental, os animais foram sacrificados. Para isso eles receberam uma dose letal de equitesin (100ml de solução contêm: 46,71 ml de H_20 destilada, 4,37g de hidrato de cloral, 2,19 g de sulfato de magnésio, 11,83ml de etanol 90%, 1g de tiopental sódico e 44,03ml de propilenoglicol). Uma vez inconscientes e não responsivos a estímulos dolorosos, os animais foram perfundidos intra-cardíacamente com uma solução salina 0,9% e, em seguida, com uma solução de formaldeído 10%. Os encéfalos foram pós-fixados com uma solução de KPBS 0,02M contendo 20% de sacarose e mantidos a uma temperatura de 4°C. Após serem mantidos nessa condição por pelo menos 24 horas, os encéfalos foram congelados e cortados no plano frontal em micrótomo de congelação, com espessura de corte de 40 µm. Lâminas histológicas foram montadas e coradas pela técnica de Nissl, a fim de visualizar a região de implantação dos eletrodos.

Quadro 1 – Divisão do protocolo experimental

Dia	Condições	# Intervalo	Caixa de Estímulo	Acesso
1	Registro Basal	1	Vazia	Livre
		2	Vazia	Livre
	Confinamento	3	Vazia	Confinado
		4	Vazia	Confinado
	Novidade	5	Pelúcia + Baunilha	Livre
		6	Pelúcia + Baunilha	Livre
		20 minutos no aparato, sem estímulo, livre acesso		
		20 minutos no aparato, gato presente, confinado		
	Gato	7	Gato	Livre
		8	Gato	Livre
		20 minutos no aparato, sem estímulo, livre acesso		
2	Contexto	9	Vazia	Livre
		10	Vazia	Livre

Os diferentes intervalos de exposição do protocolo experimental estão ordenados cronologicamente. Cada linha representa um intervalo de 10 minutos em que o animal está dentro do aparato. O quadro descreve: o nome de cada condição associada com o intervalo, o dia em que o intervalo foi realizado, o tipo de estímulo presente na caixa do estímulo e o tipo de acesso que o animal tem aos demais compartimentos do aparato. Fonte: o autor (2018).

2.8 Análise de dados comportamentais

Os dados comportamentais, obtidos via gravação de webcam, foram analisados por meio do software de análise etológica BORIS (Università Degli Studi Di Torino). Cinco comportamentos diferentes foram analisados, sendo eles:

- Exploração – o animal: (i) anda ou mantêm-se parado dentro do aparato, cheirando o ambiente ao seu redor; (ii) o animal se eleva nas patas traseiras, tocando o aparato com as dianteiras, também cheirando o ambiente ao redor.
- Avaliação de risco – o animal: (i) mantém-se parado em posição encolhida cheirando o ambiente; (ii) mantêm seu corpo esticado enquanto se aproxima ou inspeciona cautelosamente uma zona de ameaça.
- Congelamento – o animal entra em completo congelamento motor, somente interrompido por pequenas movimentações do focinho.
- Fuga – o animal volta para a caixa 1 rapidamente após aproximar-se com cautela da caixa 2.
- Outro – qualquer comportamento que não se encaixe dentro das descrições anteriores, como descansar, se assear ou se coçar. Todos nesta categoria são considerados comportamentos não defensivos e não exploratórios.

2.9 Análise de dados eletrofisiológicos

Os dados eletrofisiológicos foram analisados com o software TINT v4.2.5 (Axona), que auxiliou na separação e classificação de células individuais. Todos os tipos celulares coletados que se assemelhavam a fibras axônicas foram desconsiderados na análise, bem como quaisquer células que ficavam completamente silentes durante qualquer intervalo de 10 minutos do protocolo experimental. Desse modo, espera-se ter selecionado somente os **corpos celulares** de neurônios, cuja atividade pode ser verificada ao longo de **todo o protocolo experimental**. Seguindo ambos esses critérios, foram identificadas 39 células na dPAG de 7 animais (a quantidade de células que cada animal contribuiu, respectivamente, foi: 5, 3, 12, 3, 7, 7, 2) e 44 células nas i/dlSC de 4 animais (a quantidade de células que cada animal contribuiu, respectivamente, foi: 14, 12, 10, 8).

2.10 Análise estatística dos dados

Os dados foram testados estatisticamente dentro de três paradigmas diferentes: (i) análise da atividade celular por **condição do protocolo experimental** (confinamento, novidade, gato e contexto); (ii) análise da atividade celular **por comportamento realizado pelo animal** durante aplicação do protocolo experimental; e (iii) análise da correlação da atividade celular com a **posição e velocidade do animal**. Todas as análises foram feitas com scripts de MATLAB (MathWorks) desenvolvidos no nosso laboratório para esse propósito. Em uma fase de pré-análise, o perfil de atividade celular da grande maioria das células não apresentou distribuição normal após aplicação do teste de Kolmogorov-Smirnov ($\alpha = 0,05$). Em função disso, utilizamos o teste não-paramétrico de Mann-Whitney U nas análises (i) e (ii), com a correção de Bonferroni para múltiplos testes de hipótese.

2.10.1 Análise por condição do protocolo experimental

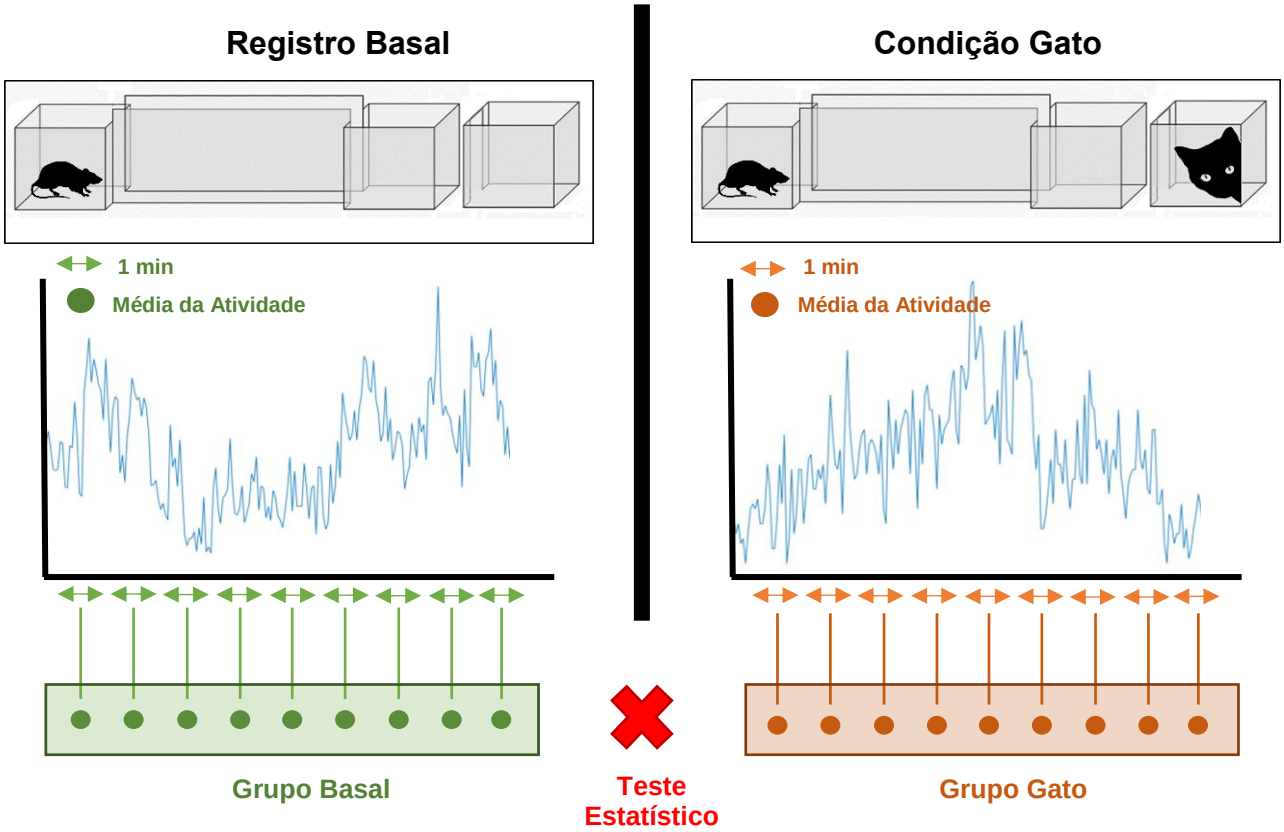
Na análise de condição, foram realizados quatro testes de hipótese para cada uma das células registrada. Nestes testes, cada condição experimental da segunda até a quinta parte do protocolo foi testada contra o registro basal de atividade celular, obtido na primeira parte do protocolo. Estas condições foram: (i) animal confinado; (ii) animal diante de novidade; (iii) animal diante do predador; e (iv) animal diante do contexto predatório.

Para todos os testes de hipótese realizado, o procedimento de processamento dos dados foi o mesmo: dado uma célula X, a atividade média desta célula X era calculada a cada 60 segundos em uma dada condição Y, e essa média valia como um ponto de observação para o teste não-paramétrico. O conjunto de observações repetidas formado dessa maneira ($n = 20$) compunha o grupo da condição Y, que seria testado contra o grupo de observações repetidas do registro basal ($n = 20$). Esse processo está esquematizado em um exemplo na **Figura 4**. Para a dPAG, o valor de alfa corrigido por Bonferroni para esta análise de condição foi de $\alpha = 3,21 \times 10^{-4}$. Já para as i/dlSC, o valor de alfa corrigido por Bonferroni para esta análise de condição foi de $\alpha = 2,78 \times 10^{-4}$.

2.10.2 Análise por comportamento realizado pelo animal

Na análise comportamental, os comportamentos dos animais foram analisados para cada célula dentro de cada uma das cinco condições experimentais. Com isso em mente, a explicação da análise a seguir vale para uma célula X em uma dada condição Y: o rato, na dada condição Y, realizou uma certa quantidade de comportamentos A, B, C, etc. Toda vez que o rato realizou o comportamento B a partir do comportamento A, isso foi chamado de **Transição Comportamental Única** (TCU) A-B (*única* usado no sentido de inequívoca, pois é diferente da transição A-C, B-C e B-A, por exemplo). Seguindo este exemplo, todas as TCUs A-B foram isoladas, e atividade da célula nos 4 segundos finais dos comportamentos A e nos 4 segundos inicias do comportamento B foi obtida.

Figura 4 – Exemplo de análise dos dados de uma célula a fim de determinar sua resposta frente a condição do gato



Com o registro completo da atividade da célula durante a condição basal, calcula-se a atividade média (medida em hertz) ao longo de intervalos de 1 minuto. Esse processo é repetido até que toda a duração da condição tenha sido contemplada, sendo 20 pontos por condição (na figura acima está exemplificado a obtenção de 9 pontos representados pelos círculos verdes). Esse conjunto de médias forma o grupo do registro basal. O exato mesmo processo é repetido para a condição do gato, obtendo também um grupo de médias para esta condição (círculos laranjas). Os dois grupos de média são testados entre si e, caso o resultado do teste seja significativo ($p \leq \alpha$), esta célula será considerada uma célula responsiva ao gato. Fonte: o autor (2018).

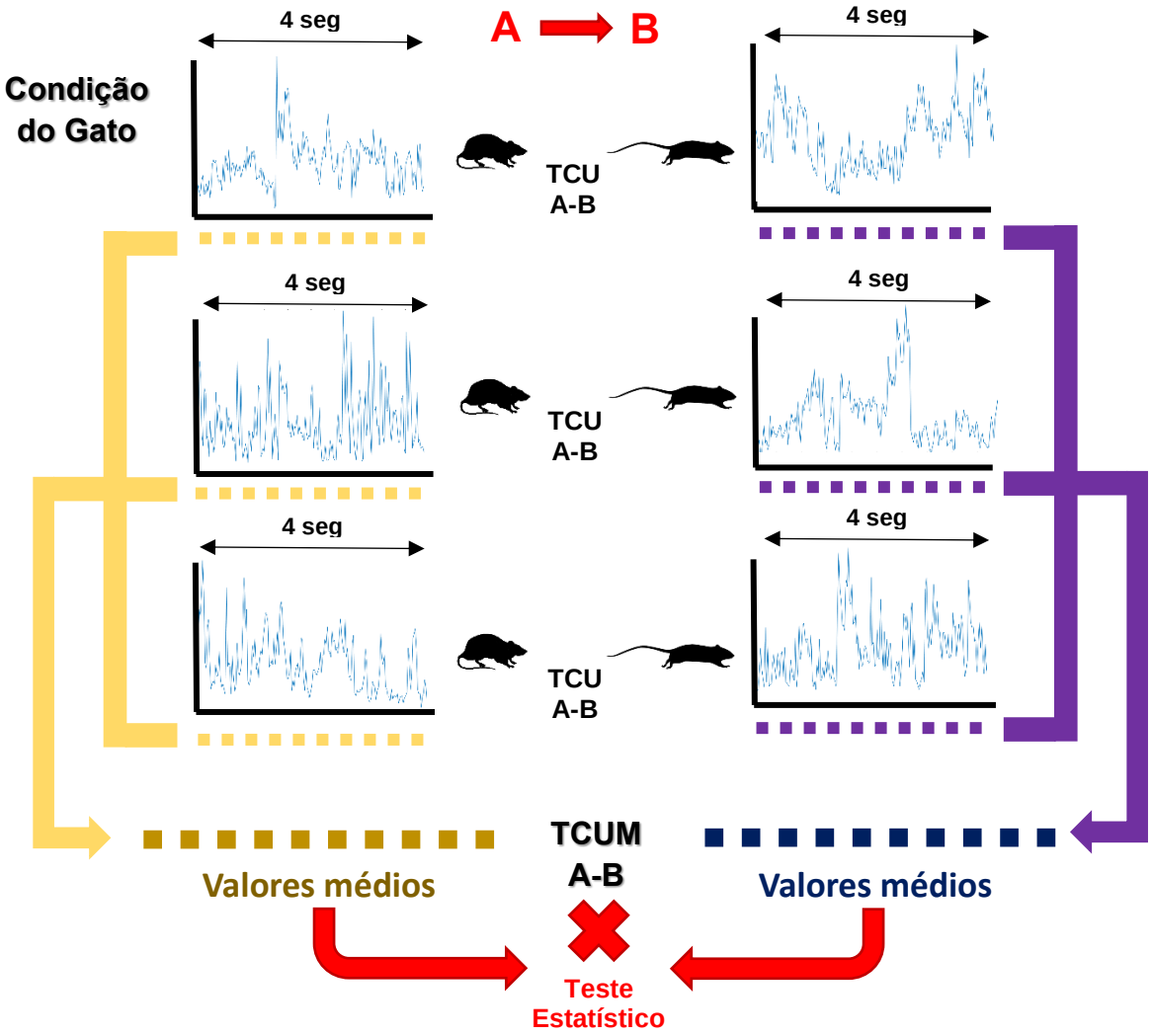
A atividade celular nesses intervalos de 4 segundos estava definida com resolução de 100ms, o que significa que a frequência da célula estava definida em quarentas pontos neste intervalo de tempo (4000ms). Assim, para cada TCU A-B, tinha-se 40 pontos de atividade celular no final do comportamento A, e no início do comportamento B. Com esses valores foi calculado, em seguida, a **Transição Comportamental Única Média** (TCUM) A-B, que foi composta a partir dos 40 pontos de atividade celular médios do final do comportamento A e dos 40 pontos de atividade celular médios do início do comportamento B, todos obtidos a partir de dos TCUs A-B por média aritmética simples. Com esses valores de média em mãos, aplicava-se o teste estatístico para os dois grupos formados: o grupo dos 4 segundos finais médios do comportamento A contra o grupo dos 4 segundo iniciais médios do comportamento B. Caso o resultado fosse significativo, isso quer dizer que a célula X durante a condição Y foi sensível a iniciação do comportamento B a partir do comportamento A. Este procedimento de análise está esquematizado em um exemplo na **Figura 5**. Para a dPAG, o valor de alfa corrigido por Bonferroni para esta análise de comportamento foi de $\alpha = 7{,}24 \times 10^{-5}$. Já para as i/dlSC, o valor de alfa corrigido por Bonferroni para esta análise de comportamento foi de $\alpha = 6{,}93 \times 10^{-5}$.

2.10.3 Análise da correlação da atividade celular com posição e velocidade

Nesta análise de correlação, a atividade celular média de uma dada célula X medida a cada 10 segundos em uma dada condição Y (n = 120) foi correlacionada com a posição média do animal ao longo do comprimento do aparato (n = 120), bem como com sua velocidade média (n = 120), medidas ao longo do mesmo período de tempo. O procedimento de análise é similar ao realizado para análise de condição, só que com intervalo de tempo diferente para cálculo das médias, e buscando aplicar um teste de correlação entre os grupos de variáveis, ao invés de um teste de hipótese entre elas. O coeficiente de correlação usado foi o coeficiente de correlação de postos de Spearman (ρ), um teste de correlação não-paramétrico, e o alfa foi corrigido para o número de testes realizados com a correção de Bonferroni. A posição do animal ao longo do comprimento do aparato é relevante para indicar a sua distância da caixa do estímulo, de modo que correlações com essa variável podem indicar dependência entre proximidade do estímulo e atividade celular.

Para a dPAG, o valor de alfa corrigido por Bonferroni para a análise de posição e de velocidade foi de $\alpha = 3{,}21 \times 10^{-4}$. Para as i/dlSC, o valor de alfa corrigido por Bonferroni para a análise de posição e velocidade foi de $\alpha = 2{,}78 \times 10^{-4}$. Nestas análises de velocidade e posição de ambas as regiões não foi incluída a condição de confinamento, pois a porta de confinamento obstruía o sinal da câmera superior que informava a posição e velocidade do animal.

Figura 5 – Exemplo de análise dos dados de uma célula a fim de determinar sua resposta frente a mudança de um comportamento A para outro comportamento B durante a condição do gato

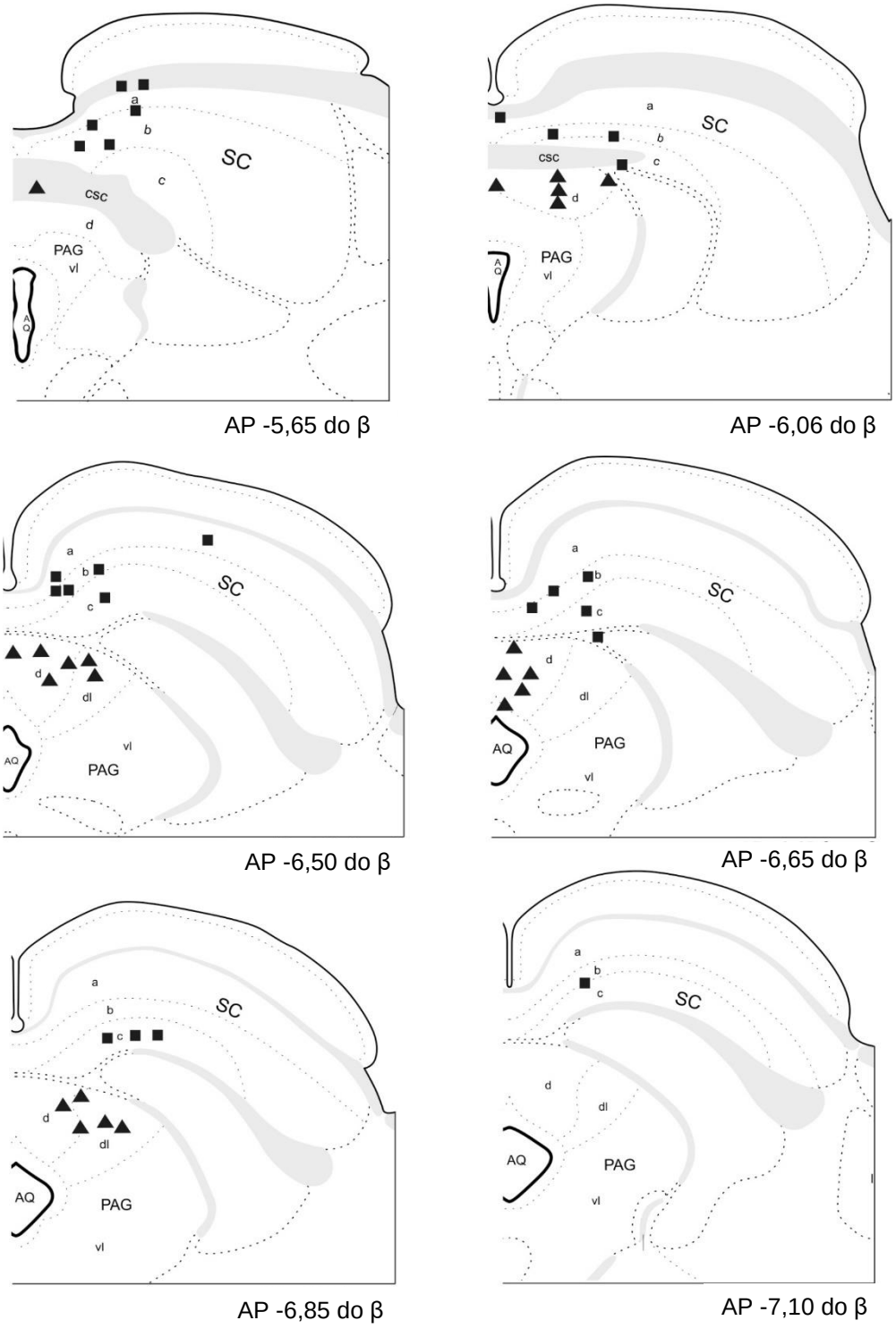


Neste exemplo, o rato realiza a Transição de Comportamento Única (TCU) A-B três vezes. Para cada TCU, a atividade da célula, medida em intervalos de 100ms, é isolada para os 4 segundos finais do comportamento A (representado por 10 quadrados amarelos, quando de fato foram 40 pontos) e 4 segundos iniciais do comportamento B (quadrados roxos). A partir do conjunto de valores de atividade durante o final do comportamento A obtêm-se uma média do perfil de atividade da célula neste momento (os 10 quadrados amarelos mais escuros), e o mesmo é obtido para o início do comportamento B (quadrados azuis escuros). Esses valores médios obtidos de antes e depois da transição comportamental representam a Transição Comportamental Única Média (TCUM) A-B para esta célula durante a condição do gato. Os valores desta TCUM são testados uns contra os outros e, em caso positivo, significa que esta célula durante a condição do gato é sensível a iniciação comportamento B a partir do comportamento A. Fonte: o autor (2018).

3 RESULTADOS

3.1 Lâminas histológicas

Figura 6 – Localização da ponta dos tetrodos identificados a partir da técnica de Nissl



■ = i/dlSC ▲ = dPAG

(Figura na página anterior). A coordenada antero-posterior (AP) de cada corte está identificada a partir do bregma (β). Quadrados (■) indicam tetrodos que atingiram as i/dlSC, enquanto triângulos (▲) indicam tetrodos que atingiram a dPAG. Para facilitar visualização, os pontos de entrada foram indicados somente em um dos lados do corte. AQ: Aqueduto do mesencéfalo; csc: comissura do colículo superior; dmPAG: coluna dorsomedial da matéria cinzenta periaqeudutal; dlPAG: coluna dorsolateral da matéria cinzenta periaquedutal; vlPAG: coluna ventrolateral da matéria cinzenta periaquedutal; SC: colículo superior; aSC, bSC e cSC: subdivisões das camadas intermediárias e profundas do colículo superior. Fonte: adaptado de Swanson (2004).

A **Figura 6** mostra os pontos de entrada dos tetrodos que coletaram células da dPAG e das i/dlSC. De forma geral, a diferença entre as regiões atingidas foi clara, com algumas células beirando o limiar entre as duas estruturas citadas. Os tetrodos considerados para a dPAG foram aqueles que atingiram a coluna dorsal e dorsolateral da estrutura, bem como um tetrodo na região da comissura do colículo superior (csc), cuja ponta estava em contato com o limiar da dPAG. Os tetrodos considerados para as i/dlSC foram todos aqueles abaixo da camada superficial da estrutura, que ficaram concentrados na região medial.

3.2 Análise da atividade celular

O resultado das análises da variação da atividade celular em função da condição, comportamento, posição e velocidade do animal serão apresentadas a seguir, em suas respectivas seções. Os testes de hipótese (Mann-Whitney U) e correlação (coeficiente de Spearman) realizados anteriormente serviram para classificar uma dada célula como responsiva ou não a uma dada condição, comportamento, posição no aparato, ou velocidade no aparato. As seções a seguir vão discutir o resultado dessas classificações para as 39 células da dPAG e as 44 células das i/dlSC e, em cima desses resultados, realizar análises adicionais de caráter mais qualitativo e descritivo para chegar a novas conclusões.

Essas análises qualitativas serão apresentadas separadamente para a dPAG e as i/dlSC, destacando as similaridades e diferenças entre as células dessas regiões. Ao final, uma última seção irá agrupar todas as possíveis funções das células analisadas (responsividade à condição, comportamento, posição ou velocidade) de modo a tentar traçar um perfil global das regiões neuroanatômicas que foram alvo deste estudo.

3.2.1 Atividade celular vs. condição experimental

Os dados organizados a seguir mostram a quantidade de células responsivas a uma condição experimental (confinamento, novidade, gato e contexto) em relação a condição do registro basal. Além disso, toda vez que uma célula foi significativamente responsiva a uma dada condição, foi calculado quantas vezes a atividade celular desta célula variou em relação a sua atividade no registro basal. Essa variação foi obtida calculando a razão: [atividade celular média ao longo da condição experimental em questão / atividade celular média ao longo do registro basal].

Atividade celular e confinamento (dPAG). 10 das 39 células da dPAG apresentaram mudança significativa de atividade no confinamento em relação ao registro basal ($p \leq 3{,}03 \times 10^{-4}$). 9 das 10 células aumentaram de atividade (1,23x até 7,42x da atividade basal média), e 1 das 10 células mostrou diminuição de atividade (0,6x da atividade basal média).

Atividade celular e confinamento (i/dlSC). 10 das 44 células das i/dlSC apresentaram mudança significativa de atividade no confinamento em relação ao registro basal ($p \leq 1{,}04 \times 10^{-4}$). 6 das 10 células aumentaram de atividade (1,23x até 5,23x da atividade basal média), e 4 das 10 células mostraram diminuição de atividade (0,53x até 0,8x da atividade basal média).

Atividade celular e novidade (dPAG). 13 das 39 células da dPAG apresentaram mudança significativa de atividade durante a novidade em relação ao registro basal ($p \leq 1{,}58 \times 10^{-4}$). 12 das 13 células aumentaram de atividade (1,2x até 4,5x da atividade basal média), e 1 das 13 células mostrou diminuição de atividade (0,5x da atividade basal média).

Atividade celular e novidade (i/dlSC). 9 das 44 células das i/dlSC apresentaram mudança significativa durante a novidade em relação ao registro basal ($p \leq 1{,}03 \times 10^{-4}$). 8 das 9 células nas i/dlSC aumentaram de atividade (1,35x até 8,44x da atividade basal média), e 1 das 9 células mostrou diminuição de atividade (0,66x da atividade basal média).

Atividade celular e o gato (dPAG). 25 das 39 células da dPAG apresentaram mudança significativa de atividade durante o gato em relação ao registro basal ($p \leq 1{,}51 \times 10^{-4}$). 21 das 25 células aumentaram de atividade (1,22x até 22,28x da atividade basal média, com um valor bem acima do resto de 99,48x), e 4 das 25 células mostraram diminuição de atividade (0,43x até 0,84x da atividade basal média).

Atividade celular e o gato (i/dlSC). 26 das 44 células das i/dlSC apresentaram mudança significativa de atividade durante o gato em relação ao registro basal ($p \leq 2{,}05 \times 10^{-4}$). 9 das 26 células aumentaram de atividade (1,63x até 3,89x da atividade basal média, com um valor bem acima do resto de 11,5x), e 17 das 26 células mostraram diminuição de atividade (0,01x até 0,65x da atividade basal média).

Atividade celular e o contexto predatório (dPAG). 15 das 39 células da dPAG apresentaram mudança significativa de atividade durante o contexto predatório em relação ao registro basal ($p \leq 1{,}48 \times 10^{-4}$). 12 das 15 células aumentaram de atividade (1,26x até 18,23x da atividade basal média, com um valor bem acima do resto de 63,09x), e 3 das 15 células mostraram diminuição de atividade (0,15x até 0,73x da atividade basal média).

Atividade celular e o contexto predatório (i/dlSC). 19 das 39 células das i/dlSC apresentaram mudança significativa de atividade durante o contexto predatório em relação ao registro basal ($p \leq 1{,}78 \times 10^{-4}$). 11 das 19 células das i/dlSC aumentaram de atividade (1,7x até 6,84x de atividade basal média, com um valor bem acima do resto de 66,7x), e 8 das 19 células mostraram diminuição de atividade (0,12x até 0,48x da atividade basal média).

Para verificar o efeito de uma dada condição experimental nas regiões neuronanatômicas estudadas, pode se levar em conta tanto o número de células que reagiu significativamente (medido em proporção), quanto a variação da atividade celular de cada célula em relação ao registro basal (medida pela razão da atividade celular na condição experimental pela atividade celular na condição basal). Ambos esses parâmetros serão discutidos a seguir, e ambos estão resumidos na **Tabela 1**, separados para as células que aumentaram de atividade e para as células que reduziram de atividade. Note que, devido ao fato das razões de atividade celular

variarem em escala tão grande de célula para célula, decidiu-se representar na Tabela 1 o valor da mediana do grupo (valor central), ao invés da média aritmética.

Tabela 1 – Características de resposta da dPAG e das i/dlSC para as condições experimentais

Condições Experimentais	Células que aumentaram de atividade				Células que reduziram de atividade			
	dPAG		i/dlSC		dPAG		i/dlSC	
	% do total de células	*razão de aumento*	*% do total de células*	*razão de aumento*	*% do total de células*	*razão de redução*	*% do total de células*	*razão de redução*
Confinamento	23%	2,68	14%	2,10	3%	0,60	9%	0,58
Novidade	31%	2,32	18%	1,94	3%	0,50	2%	0,66
Gato	54%	4,78	20%	2,99	10%	0,64	39%	0,21
Contexto	31%	2,16	25%	2,65	8%	0,45	18%	0,37

Tabela que indica, em porcentagem, quantas células de uma dada região responderam para as condições experimentais avaliadas em relação a condição basal. É indicado também a mediana da razão de aumento ou da razão de redução da atividade celular. Esta razão é calculada pela média de atividade da célula na condição experimental avaliada dividida pela média de atividade da célula na condição basal. A mediana indica o valor central destas razões, que foram calculadas para os grupos de células que responderam significativamente. A tabela é dividida entre as células que mostraram aumento de atividade e as que mostraram redução da atividade. Fonte: o autor (2018).

Em termos de efeitos das condições em cada região, a dPAG parece ser mais responsiva ao gato em número de células (64% das células com resposta significativa), seguido do contexto (38%), novidade (33%) e confinamento (26%). A grande maioria das células responsivas da dPAG reagiram **aumentando** sua atividade celular, seja no gato (54% de células que respondem aumentando atividade // 10% com redução), no contexto (31% // 8%), na novidade (31% // 2%) ou no confinamento (23% // 3%). Finalmente, o valor de mediana das células que aumentaram atividade na dPAG em relação ao registro basal foi maior durante o gato (4,78x), seguido do confinamento (2,68x), novidade (2,32x) e contexto (2,16x). Para a minoria de células da dPAG que reduziu sua atividade diante das condições experimentais, a variação de intensidade verificada pela mediana ficou em torno de 0,45x a 0,6x da condição basal.

Para as células das i/dlSC, estas também foram mais responsivas ao gato em número de células (59% das células com resposta significativa), seguidas do contexto (43%), confinamento (23%) e novidade (20%). Em termos do balanço entre células que aumentaram de atividade e aquelas que diminuíram, as i/dlSC tiveram um panorama mais heterogêneo do que a dPAG, variando de condição para condição.

Para a condição de confinamento e contexto nas i/dlSC, houve uma quantidade ligeiramente maior de células que aumentaram de atividade em relação as que reduziram (confinamento: 14% aumento // 9% diminuição, contexto: 25% // 18%). Para a condição de novidade, a proporção de células que aumentou de atividade foi muitas vezes maior do que a proporção que reduziu (18% // 2%). Já para a condição do gato, diferencialmente, houve mais células que reduziram de atividade do que aumentaram (20% // 39%). O valor de mediana das células que aumentaram de atividade nas i/dlSC foi maior no gato (2,99x), seguido do contexto (2,65x), confinamento (2,10x) e novidade (1,94x). O valor de mediana das células que reduziram de atividade nas i/dlSC foi menor no gato (0,21x), seguido do contexto (0,37x), confinamento (0,58x) e novidade (0,66x).

A fim de permitir comparar adequadamente os efeitos das condições experimentais nas regiões neuroanatômicas estudadas, é preciso integrar as informações de quantidade de células que responderam a uma condição com a informação da variação da atividade destas células na condição. Isto foi feito na **Figura 7** a partir de um cálculo simples de média ponderada usando os valores colocados na Tabela 1. O cálculo foi feito a partir da seguinte fórmula:

$$E.C. = (f.c.r. \times m.a.c) + [(1 - f.c.r.) \times 1]$$

Onde:

E.C. = Efeito da Condição

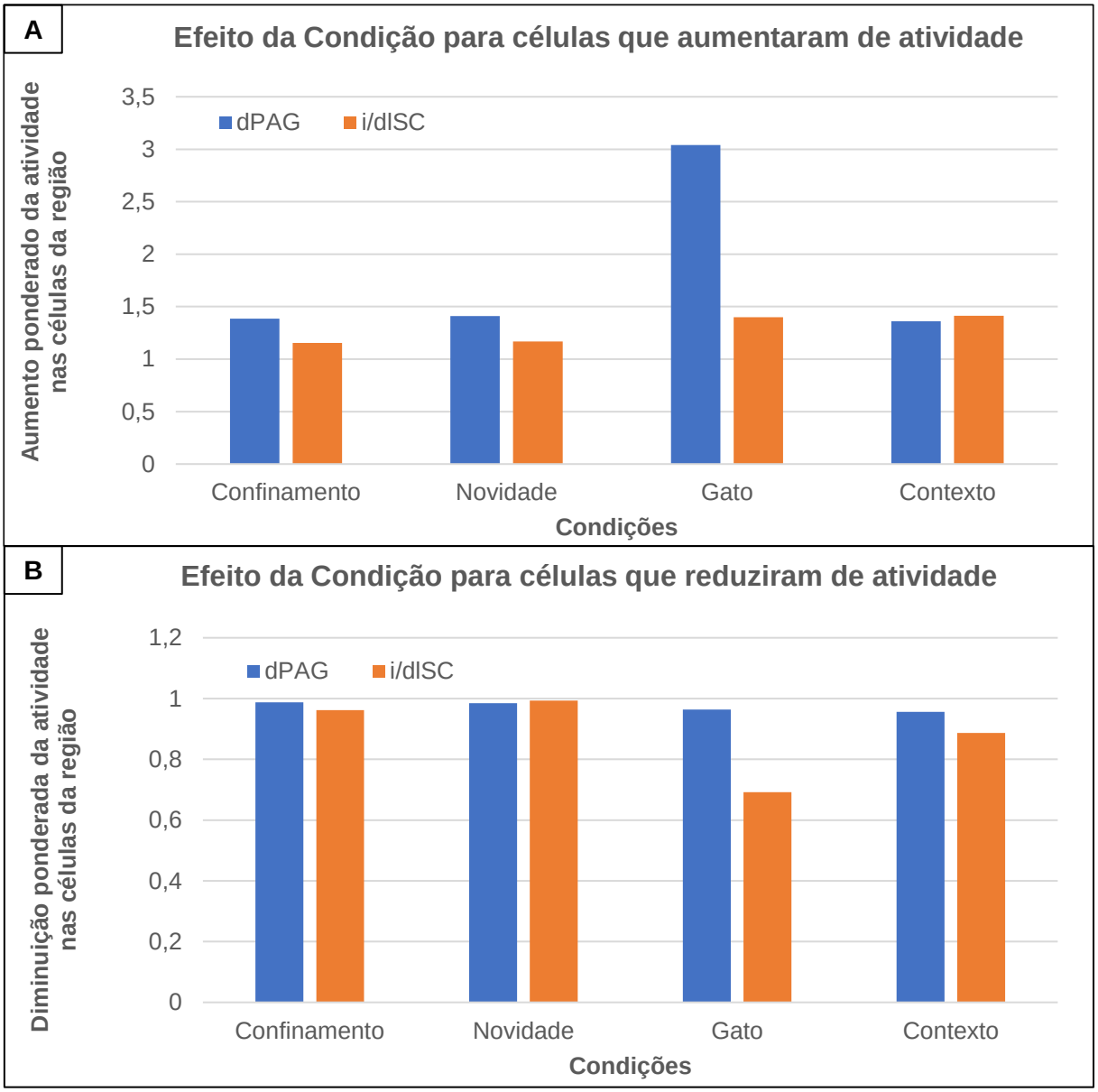
f.c.r. = fração de células responsivas

m.a.c. = mediana da atividade celular

Essa fórmula permite calcular o efeito de uma dada condição na dPAG ou nas i/dlSC, tanto para as células que aumentaram de atividade quanto para aquelas que reduziram. O valor obtido E.C. é um valor simbólico que indica quantas vezes a atividade de uma célula na dPAG ou nas i/dlSC teria variado na condição observada em relação a condição basal, caso essa variação de atividade tivesse afetado **todas** as células da região. Essa variação é calculada a partir de uma ponderação da mediana, e não da média, devido à grande variabilidade no modo como cada célula

muda de atividade. Sendo assim, o valor de E.C. é usado neste estudo como um indicador do efeito global de uma dada condição nas regiões estudadas, levando em conta quantas células foram ativadas e a intensidade de ativação destas células.

Figura 7 – Gráfico de barras mostrando valor estimado do Efeito da Condição na dPAG e nas i/dlSC, para células com aumento e diminuição de atividade



A. Gráfico mostrando o efeito de aumento de atividade celular, ponderado para todas as células da dPAG e das i/dlSC. **B**. Gráfico mostrando o efeito de redução de atividade celular, ponderado para todas as células da dPAG e das i/dlSC. Fonte: o autor (2018).

Os resultados obtidos indicam que, para ambas as regiões, a condição que produz respostas mais intensas é a condição do **gato**, mas de modos diferentes. Como é possível ver na Figura 7A, para as células que **aumentaram de atividade na dPAG**, o E.C. vale em torno de 3,04x do valor basal, em contraste com os valores das

outras condições que ficaram estimados entre 1,35x~1,4x do valor basal. Entretanto, para as células que aumentaram de atividade nas i/dlSC, não pareceu haver grande diferença entre as condições, com E.C. estimado entre 1,15x~1,41x. Na Figura 7B é possível ver que, para as células que diminuíram de atividade na dPAG, o efeito global da diminuição foi praticamente negligenciável, variando entre 0,95x~0,98x ao longo das condições. **O efeito de diminuição nas i/dlSC**, por sua vez, foi bem intenso no gato, atingindo o patamar de 0,69x, e um pouco menos intenso no contexto, atingindo valor de 0,88x. Nas condições de confinamento e novidade o efeito de redução foi muito baixo, ficando entre 0,96x e 0,99x. No **Apêndice A** estes resultados estão apresentados de outra maneira, na forma de um *heat map*.

A partir desses dados, é possível tirar duas conclusões principais: (i) as células da dPAG, de maneira global, respondem de forma mais intensa para o estímulo do predador, com um aumento de atividade celular; e (ii) as células das i/dlSC, de maneira global, também respondem de forma intensa para o estímulo do predador, mas com diminuição de sua atividade celular. Para as outras condições, as regiões neuroanatômicas respondem de forma mais próxima entre si, com exceção das i/dlSC no contexto, onde há uma certa redução de atividade celular, menos intensa do que durante o gato.

Finalmente, uma última questão nesta parte da análise é se uma célula que se mostrou responsiva a um certo tipo de efeito (o gato, por exemplo), tinha mais chance de responder para um outro tipo de efeito (o contexto, por exemplo). Para averiguar essa possibilidade, aplicamos o Teste Exato de Fisher para cada par de combinações de condições possível, considerando $\alpha = 0,05$. Este teste indica quão maior é a chance de, por exemplo, uma célula de confinamento também ser uma célula de novidade em contraste com uma célula que não é de confinamento ser de novidade. Os valores obtidos dessas razões e os valores de *p* associados estão colocados na **Tabela 2**, tanto para a dPAG como para as i/dlSC. Como é possível ver a partir dos valores tabelados, foram obtidas consideravelmente mais interações para as células da dPAG do que para as células das i/dlSC. Na dPAG: uma célula que respondeu ao confinamento tinha mais chance de responder ao gato e ao contexto; uma célula que respondeu a novidade tinha mais chance de responder ao gato; e uma célula que respondeu ao gato tinha mais chance de responder ao contexto. Todas as recíprocas também são verdadeiras. Já para as i/dlSC, a única interação foi que células que responderam ao gato tinham mais chance de responder ao contexto (e vice-versa).

Tabela 2 – Chance de duas condições experimentais interagirem

	Confinamento				Novidade			
	dPAG		i/dlSC		dPAG		i/dlSC	
	Chance	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*
Confinamento	-	-	-	-	1,48	0,704	2,00	0,402
Novidade	1,48	0,704	2,00	0,402	-	-	-	-
Gato	∞	0,007	1,44	0,724	5,89	0,041	1,50	0,716
Contexto	6,13	0,027	1,43	0,723	3,06	0,164	1,07	1,000
	Gato				**Contexto**			
	dPAG		**i/dlSC**		**dPAG**		**i/dlSC**	
	Chance	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*
Confinamento	∞	0,007	1,44	0,724	6,13	0,027	1,43	0,723
Novidade	5,89	0,041	1,50	0,716	3,06	0,164	1,07	1,000
Gato	-	-	-	-	6,50	0,164	19,25	0,000
Contexto	6,50	0,038	19,25	0,000	-	-	-	-

Tabela que indica a razão da chance de duas condições experimentais interagirem em comparação a elas não interagirem, calculada pelo Teste Exato de Fisher. Os valores em vermelhos tiveram $p < 0,05$. Fonte: o autor (2018).

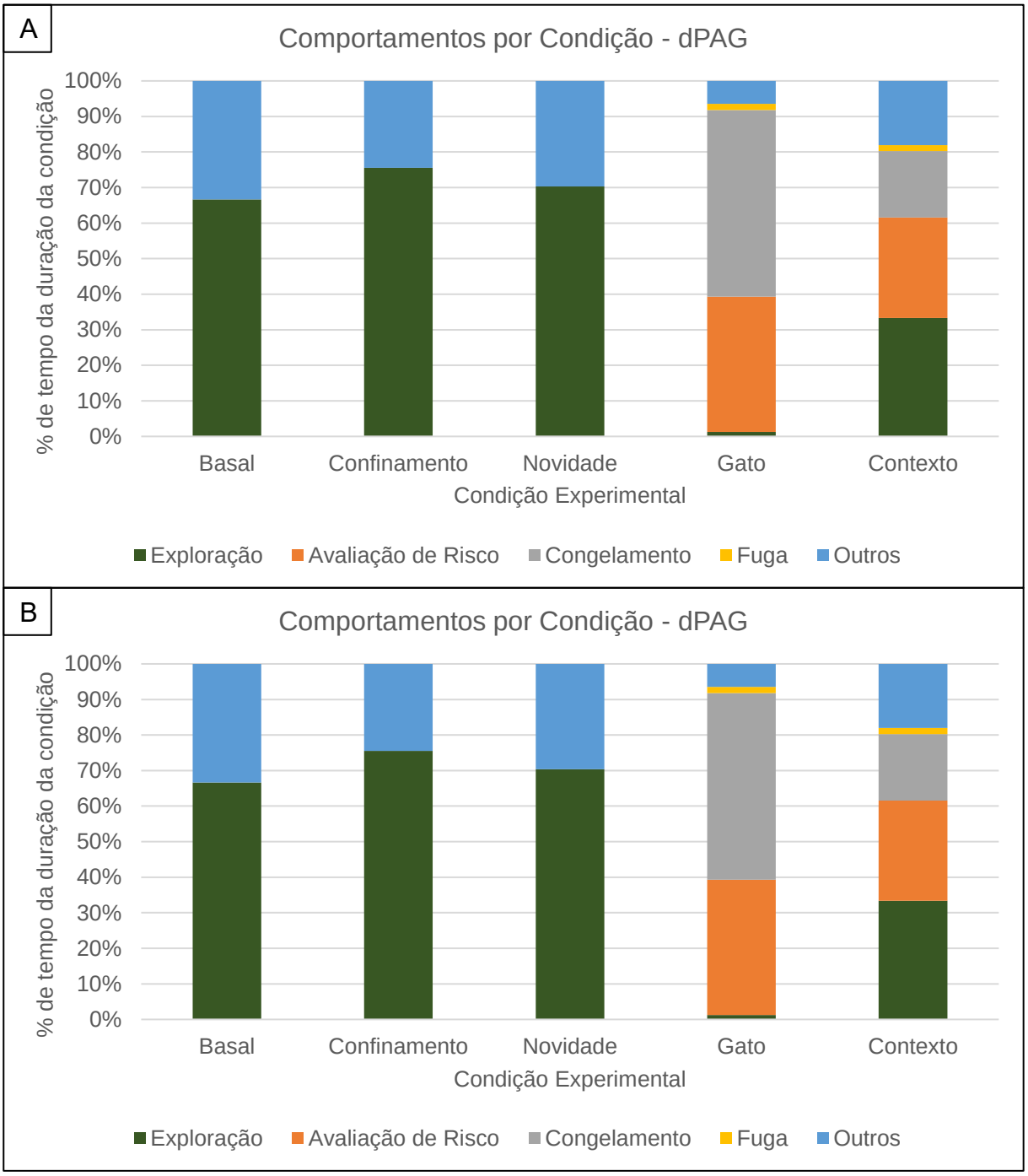
3.2.2 Atividade celular vs. comportamento

Nesta seção, quatro questões diferentes serão abordadas. Tais questões são: 1) de que forma o repertório comportamental dos grupos de animais da dPAG e das i/dlSC variou entre as condições; 2) quantas células mostraram-se sensíveis as Transições Comportamentais Únicas Médias (TCUMs) e durante quais condições; 3) vendo as células que responderam as TCUMs, quais dentre elas respondiam mais a alguma TCUM em particular em uma dada condição específica; e, finalmente, 4) de que forma a atividade das células que respondiam a TCUMs se alterou para cada TCUM em particular (se havia ou não um padrão de alteração).

1) O repertório comportamental apresentado durante as condições. O repertório comportamental apresentado pelos animais variou notavelmente entre as condições, tanto para o grupo da dPAG quanto para o grupo das i/dlSC. Até a apresentação do gato, os animais de ambos os grupos só realizaram comportamentos exploratórios e outros comportamentos não relacionados a respostas de medo (descansar, se coçar, se assear). Durante a condição do gato e durante o contexto, o repertório mudou de modo a ser formado principalmente por comportamentos de defesa (congelamento, avaliação de risco, fuga), sendo que congelamento foi o comportamento mais comum durante o gato, e avaliação de risco o comportamento mais comum durante o contexto,

em ambos os grupos. A **Figura 8** mostra estes dados em forma gráfica tanto para o grupo de animais da dPAG (n = 7) quanto para o grupo das i/dlSC (n = 4).

Figura 8 – Gráfico de barras mostrando o tempo de expressão dos comportamentos em porcentagem, na dPAG e nas i/dlSC



A. Gráfico mostrando quanto do tempo de uma dada condição experimental, em média, o grupo de animais da dPAG executou cada comportamento. **B.** Gráfico mostrando quanto do tempo de uma dada condição experimental, em média, o grupo de animais das i/dlSC executou cada comportamento. Fonte: o autor (2018).

2) A sensibilidade das células da dPAG e das i/dlSC para TCUMs. A alteração de atividade celular foi verificada para as diversas TCUMs calculadas. Isto é, se o animal mudava de um comportamento A para outro comportamento B, foi visto se a atividade da célula 4 segundos antes da mudança foi diferente da atividade da célula 4 segundos logo depois da mudança. Isto foi verificado para cada célula dentro de cada uma das cinco condições avaliadas. Sendo assim, é possível que uma célula que tenha alterado sua atividade durante uma ou mais TCUMs em uma dada condição (por exemplo, o gato) não altere sua atividade em outra condição (por exemplo, o contexto). Evidentemente, também é possível que a mesma célula se mostre sensível a uma ou mais TCUMs em mais de uma condição.

No total, 12 das 39 células da dPAG (31% do total) apresentaram alteração de atividade celular em pelo menos uma TCUM para pelo menos uma das cinco condições avaliadas (para cada TCUM: $p \leq 7{,}24 \times 10^{-5}$), enquanto as 27 células restantes não alteraram sua atividade para qualquer TCUM, em qualquer uma das condições. O perfil de resposta dessas 12 células está detalhado no **Quadro 2**.

Como é possível observar pelo quadro, uma proporção pequena das células da dPAG se mostrou sensível a TCUMs nas condições basal (5% do total de 39 células), confinamento (5%), e novidade (3%). Já nas condições de gato (15%) e contexto (23%), uma proporção maior se mostrou responsiva. Adicionalmente, 5 das 6 células que se mostraram sensíveis a TCUMs durante o gato também se mostraram sensíveis durante o contexto. Similarmente, 5 das 9 células que se mostraram sensíveis a TCUMs no contexto também foram sensíveis durante o gato. Isso indica que a chance de uma célula responder durante o gato e novamente durante o contexto está vinculada e, portanto, a resposta comportamental durante estas condições é característica de um grupo específico de células. Tomando esses dados em conjunto, podemos concluir que as células da dPAG são mais responsivas a comportamentos durante condições de alto risco, e que a sensibilidade à mudança comportamental nestas condições de alto risco é característica de um subgrupo específico de células dentro desta região.

Para as i/dlSC, 18 das 44 células (41%) mostraram alteração de atividade celular de forma significativa em pelo menos uma TCUM para pelo menos uma das cinco condições experimentais avaliadas (para cada TCUM: $p \leq 6{,}93 \times 10^{-5}$), enquanto 26 células restantes não alteraram sua atividade para qualquer TCUM, em qualquer

uma das condições. O perfil de resposta dessas 18 células também está detalhado no Quadro 2.

Quadro 2 – Células da dPAG e das i/dLSC responsivas a comportamento

Células na dPAG responsivas a comportamento					
# Célula	**Basal**	**Confinamento**	**Novidade**	**Gato**	**Contexto**
1				●●●●	●●
2				●	●
3					●
4				●	
5			●	●	●●
6				●	●
7	●●				●
8	●				
9					●●
10		●			●●●
11		●			
12				●	●
% do Total	**5%**	**5%**	**3%**	**15%**	**23%**

Células nas i/dlSC responsivas a comportamento					
# Célula	**Basal**	**Confinamento**	**Novidade**	**Gato**	**Contexto**
1				●	●
2	●			●●	
3	●●	●	●●	●	●●
4	●●	●	●	●●	●
5			●		
6	●				
7				●	●●
8				●	
9	●●		●●	●●	●●●●●
10	●				
11				●	
12		●		●●	
13		●		●	
14		●	●		●●
15		●●		●	
16				●	●●
17	●●	●	●●		●●
18	●	●●	●		
% do Total	**18%**	**18%**	**16%**	**27%**	**18%**

Quadro mostrando células da dPAG e das i/dlSC que tiveram alteração significativa de sua atividade celular durante uma dada Transição Comportamental Única Média (TCUM), representadas pelo círculo preenchido (●). A presença de mais de um círculo na mesma condição indica resposta a mais de uma TCUM (por exemplo, resposta para a transição **exploração-outros** e para a transição **fuga-congelamento**). De modo similar, a mesma célula pode responder a transições comportamentais em uma dada condição e não responder em outras. No final está indicado o percentual, por condição, que essas células representam do total das células da dPAG ou das i/dlSC. Fonte: o autor (2018).

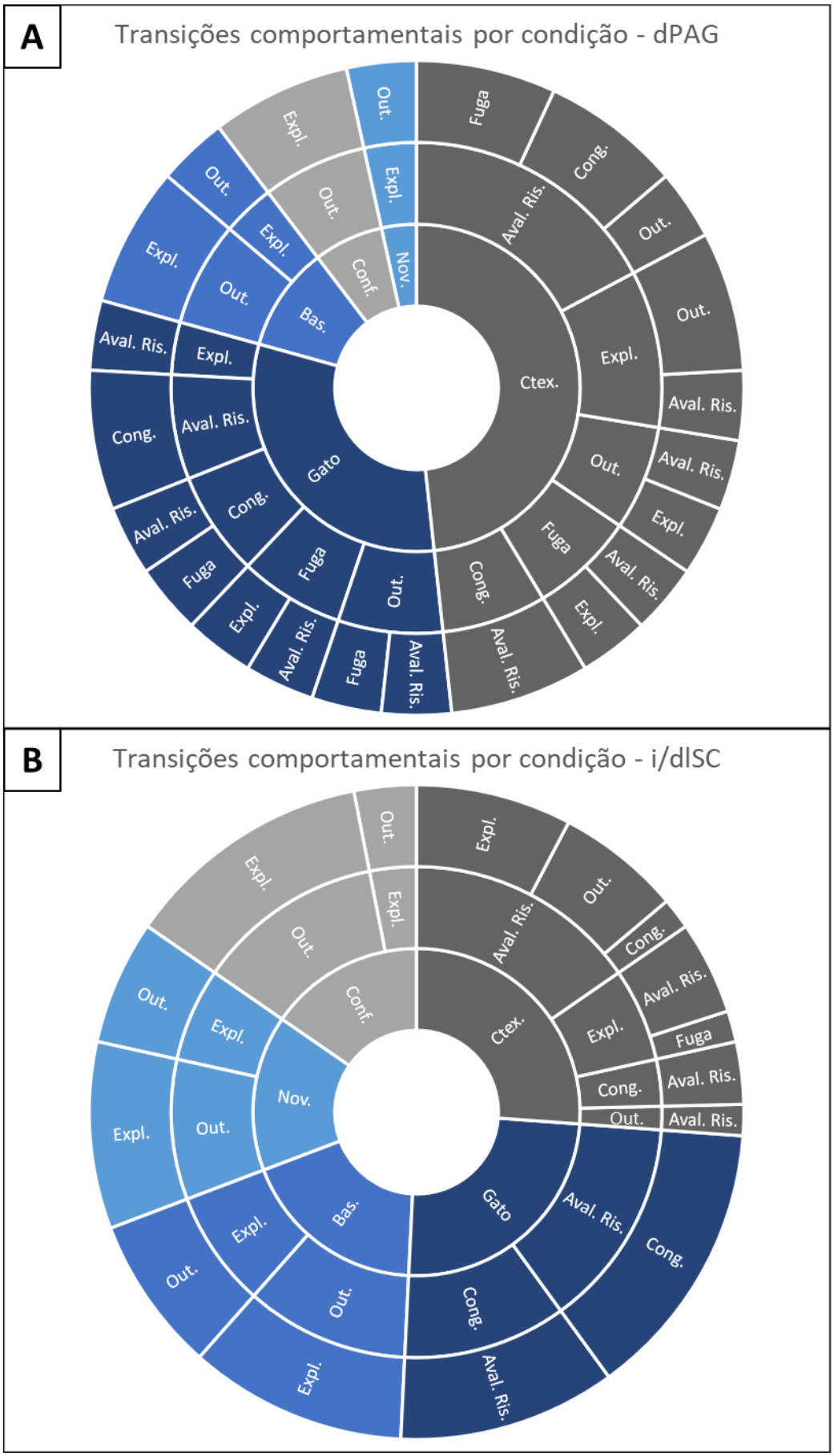
É possível observar neste quadro que a proporção de células sensíveis a TCUMs nas i/dlSC não parece se alterar tanto entre as condições, com 18% das células sensíveis durante o registro basal, 18% no confinamento, 16% na novidade,

27% no gato e 18% no contexto. De fato, parece haver um ligeiro aumento de resposta durante a condição do gato, somente. Além disso, as células das i/dlSC que respondem a TCUMs em uma condição parecem ter chances maiores de responderem a TCUMs em outra condição. Isso pode ser visto pelo fato que somente 4 das 18 células responsivas a TCUMs apresentam resposta durante uma única condição. Tomando esses dados em conjunto, podemos concluir que as células das i/dlSC não apresentam preferência de resposta comportamental a uma condição, com exceção do gato em que há pequeno aumento da resposta, e que a sensibilidade para mudanças comportamentais do animal é característica de um subgrupo específico de células dentro desta região.

3) Tipos de TCUM para as quais as células da dPAG e das i/dlSC foram sensíveis. Em termos de quais tipos de TCUMs foram realizadas, isso variou de condição para condição, visto que os comportamentos de defesa só foram iniciados pelos animais a partir da condição do gato, tanto para o grupo de animais da dPAG quanto para o grupo das i/dlSC (Figura 8). Na dPAG, para as condições de baixo risco (basal, novidade e confinamento), o rato apenas alternou entre comportamentos exploratórios e outros comportamentos não defensivos. Já durante o gato, 67% das TCUMs corresponderam a transições em que o rato iniciava um comportamento de defesa (congelamento, avaliação de risco ou fuga), enquanto 33% das vezes ele iniciava comportamentos não defensivos. Proporções similares foram encontradas para o contexto (64% // 36%). Isto indica que o aumento da responsividade a transições comportamentais na dPAG durante as condições de alto risco está relacionado à apresentação de comportamentos defensivos. A **Figura 9A** sintetiza as informações sobre TCUMs em cada condição, na dPAG.

Notavelmente, as células das i/dlSC não parecem ter uma preferência de resposta para alguma TCUM em particular. Durante as condições de baixo risco, elas responderam de modo bem equilibrado para as TCUMs de comportamentos não-defensivos e, durante as condições de alto risco, responderam mais para TCUMs defensivas. Essas respostas celulares mantiveram-se próximas das mesmas proporções, como pode ser visto pelo tamanho similar das seções em cores na **Figura 9B**, e pelo fato que nenhum comportamento iniciado (círculo medial da Figura 9B) parece ocupar muito mais espaço que os demais, com exceção da avaliação de risco durante o contexto, que representou 59% de todos os comportamentos iniciados.

Figura 9 – Tipos de transições comportamentais por condição

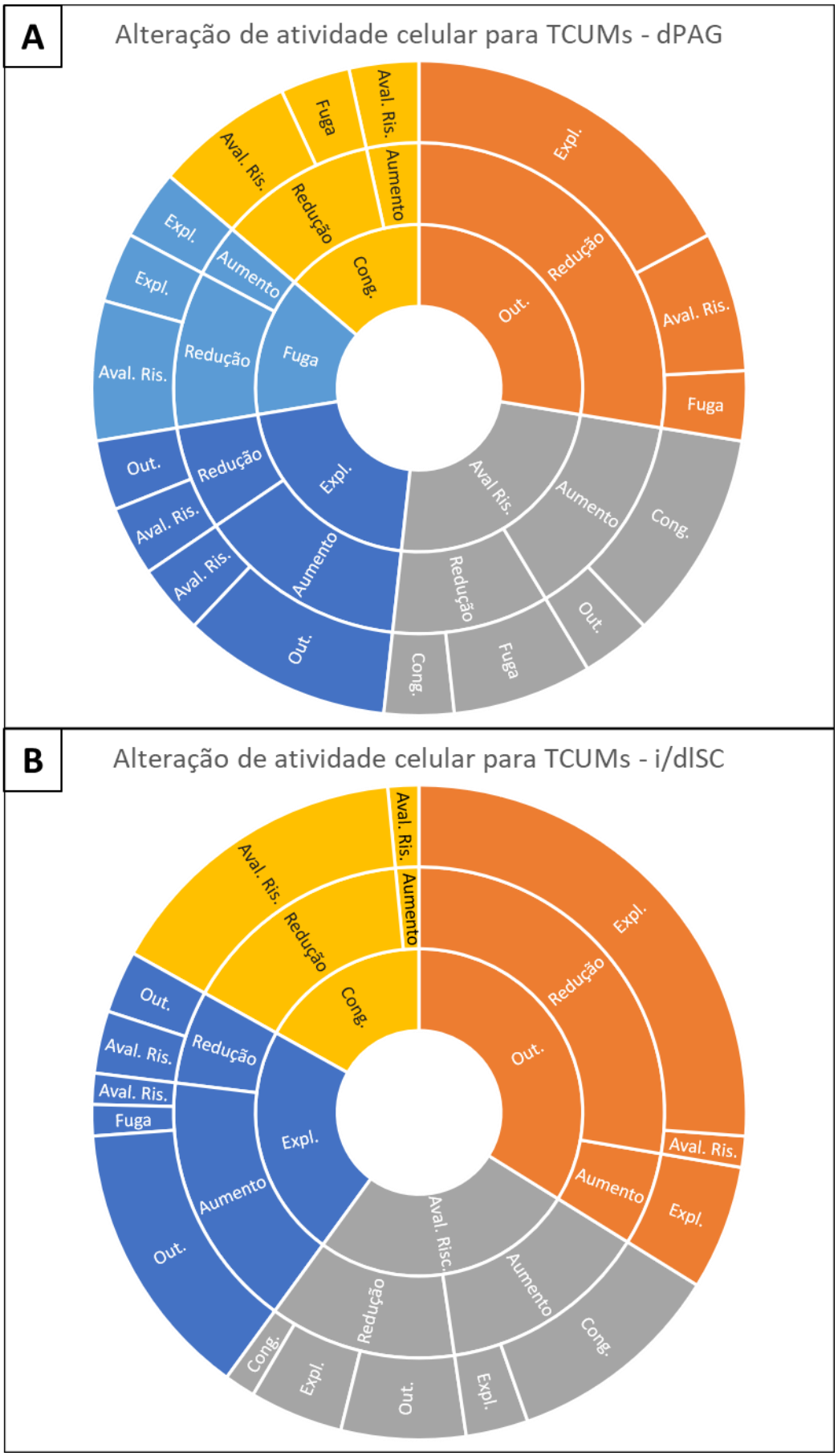


(Figura na página ao lado). Gráficos concêntricos indicando a relação entre as transições comportamentais e as condições experimentais na dPAG (**A**) e nas i/dlSC (**B**). Para ler o gráfico, comece nos círculos de dentro e vá lendo para fora. Indo de dentro para fora temos: as condições avaliadas, seguido dos comportamentos iniciados numa dada condição, seguido dos comportamentos que precederam um dado comportamento iniciado. Por exemplo, na **Figura 9A**, na condição de Confinamento, em cinza-claro, o comportamento *"Outro"* foi iniciado a partir do comportamento de *"Exploração"*. Ainda na **Figura 9A**, na condição de Gato, em azul mais escuro, o comportamento de *"Fuga"* foi iniciado a partir, em parte, do comportamento de *"Exploração"* e, em parte, do comportamento de *"Avaliação de Risco"*. Nestes gráficos, quanto maior uma seção de um dado círculo, maior é a parte que ela representa. Por exemplo, é possível observar para a **Figura 9A** que o maior número de TCUMs significativas estava no Contexto e que o comportamento de *"Avaliação de Risco"* foi o mais iniciado dentro do Contexto. **Bas.**: Registro Basal; **Conf.**: Confinamento; **Nov.**: Novidade; **Ctex.**: Contexto; **Expl.**: Exploração; **Out.**: Outro; **Ava. Ris.**: Avaliação de Risco; **Cong.**: Congelamento. Fonte: o autor (2018).

4) Padrão de alteração de atividade das células da dPAG e das i/dlSC para um dado tipo de TCUMs. Uma última questão referente ao perfil de atividade dessas regiões e o comportamento é se havia alguma consistência no modo como a atividade das células mudava quando o rato iniciava um novo comportamento. De fato, tal padrão parece ser visto para alguns comportamentos, tanto na dPAG quanto nas i/dlSC. Para cada TCUM significativa, foi visto se houve um aumento da atividade da célula quando o novo comportamento foi iniciado ou uma diminuição da atividade da célula. O perfil encontrado para a dPAG e para as i/dlSC está apresentado de forma gráfica na **Figura 10**. Em ambas as regiões dois comportamentos apresentam uma certa consistência: o comportamento de congelamento e o grupo de comportamentos não defensivos que excluía exploração (chamado de "outro"). Nestes dois comportamentos, pareceu haver uma consistente redução de atividade celular a partir de comportamentos precedentes, que em sua maioria foram os comportamentos de avaliação de risco e exploração, respectivamente. Outra característica interessante observada para ambas as regiões é que, quando o comportamento de avaliação de risco era iniciado, a célula tendia a aumentar de atividade se o comportamento precedente fosse congelamento.

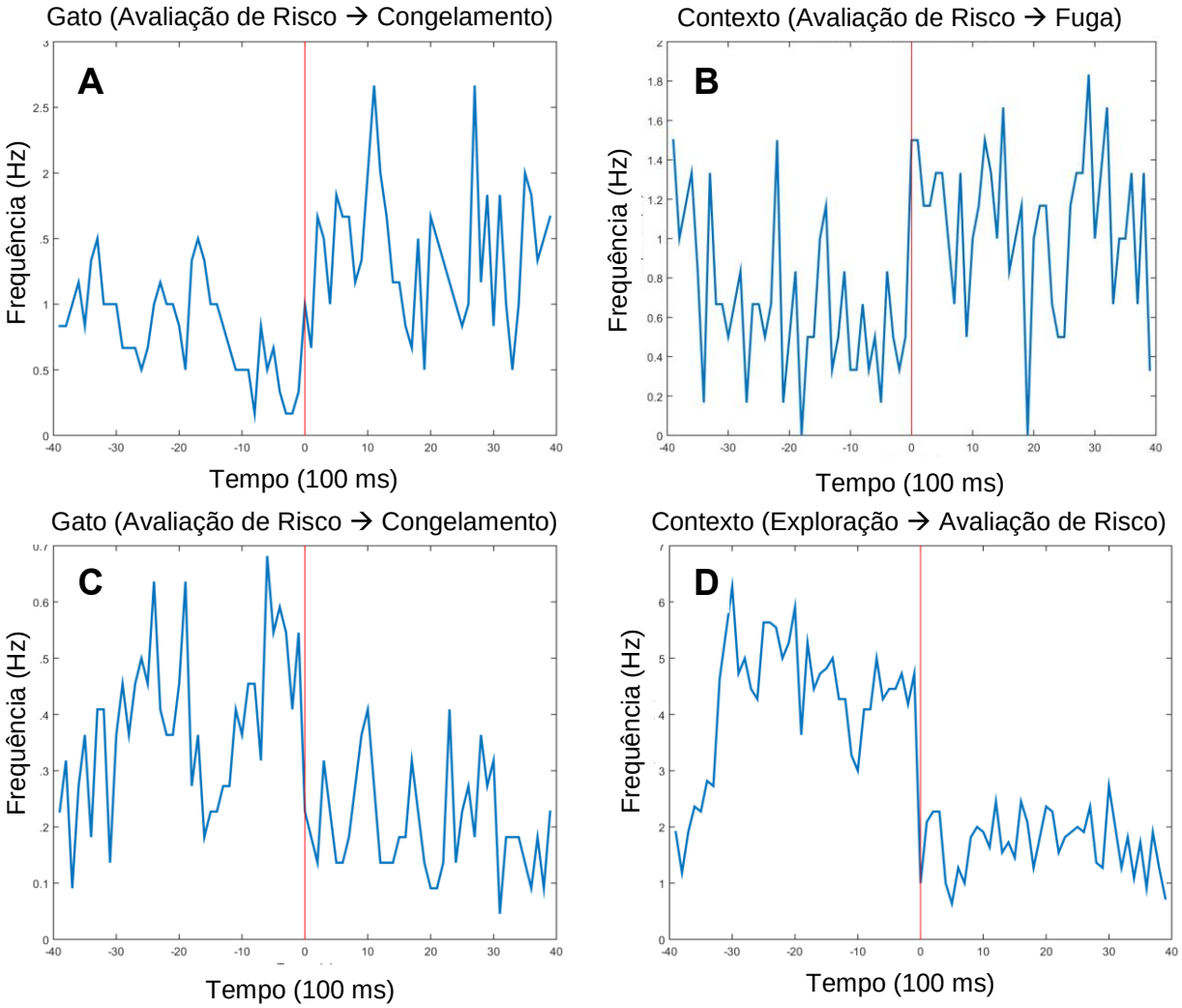
Estes resultados indicam que o tipo de mudança na atividade celular (aumento ou redução de atividade) para as células responsivas a TCUMs está correlacionado com a TCUM observada, em alguns casos. Congelamento iniciado a partir de avaliação de risco leva a redução de atividade, assim como outros comportamentos não defensivos iniciados a partir de exploração. Avaliação de risco iniciada a partir de congelamento, por sua vez, leva a aumento de atividade. Essa correlação indica que o nível de atividade celular está relacionado com o novo padrão motor selecionado, não só meramente a uma mudança ente padrões motores.

Figura 10 – Característica da alteração de atividade celular para TCUMs



(Figura na página ao lado). Gráficos concêntricos indicando a relação entre alteração da atividade celular e TCUM observada na dPAG (**A**) e nas i/dlSC (**B**). Para ler o gráfico, comece nos círculos de dentro e vá lendo para fora. Indo de dentro para fora temos: os comportamentos que foram iniciados, seguido de qual foi a mudança observada na atividade celular, seguido do comportamento que precedeu o comportamento iniciado. Por exemplo, na **Figura 8A**, a seção cinza claro indica que quando o animal iniciava o comportamento de *"Avaliação de Risco"* (círculo interno), havia principalmente um aumento de atividade celular (círculo médio) a partir de dois comportamentos distintos: *"Congelamento"* e *"Outro"* (círculo externo). Havia também neste caso uma redução de atividade celular (círculo médio) quando o comportamento era iniciado a partir do comportamento de *"Fuga"* ou *"Congelamento"* (círculo externo). Nestes gráficos, quanto maior uma seção de um dado círculo, maior é a parte que ela representa. Por isso é possível concluir, tanto para a **Figura 8A** como para a **Figura 8B**, que o comportamento de *"Congelamento"* (em amarelo), quando iniciado, está correlacionado principalmente com redução na atividade celular (porção do círculo médio com seção maior) a partir do comportamento de *"Avaliação de Risco"* (porção do círculo externo com seção maior). **Expl.**: Exploração; **Out.**: Outro; **Ava. Ris.**: Avaliação de Risco; **Cong.**: Congelamento. Fonte: o autor (2018).

Figura 11 – Exemplos de peri-histogramas de células responsivas a TCUMs



Peri-histogramas de atividade celular (medida pela frequência em Hz) 4 segundos antes e 4 segundos depois de uma dada mudança de comportamento. **A.** TCUM Avaliação de Risco ➔ Congelamento de uma célula da dPAG, durante o gato. **B.** TCUM Avaliação de Risco ➔ Fuga de uma célula da dPAG, durante o contexto. **C.** TCUM Avaliação de Risco ➔ Congelamento de uma célula das i/dlSC, durante o gato. **D.** TCUM Exploração ➔ Avaliação de Risco de uma célula das i/dlSC, durante o contexto. Fonte: o autor (2018).

Para exemplificar os casos de TCUMs onde um padrão parece ter sido encontrado (como Avaliação de Risco ➔ Congelamento), a **Figura 11** traz peri-histogramas do comportamento de algumas células sensíveis a TCUMs tanto na dPAG como nas i/dlSC.

3.2.3 Atividade celular vs. posição e velocidade

Atividade celular na dPAG e posição. 24 das 39 células (62%) na dPAG apresentaram correlação com a posição do animal no aparato em pelo menos uma das condições verificadas ($p \leq 3{,}21 \times 10^{-4}$). A posição foi medida como distância da caixa de estímulos, logo, correlações positivas com esta variável indicam que a célula disparava mais quanto mais longe do estímulo, e correlações negativas indicavam o contrário. O número de células que apresentou correlação por condição foi: 3 células no registro basal, 3 na novidade, 11 durante o gato e 13 durante o contexto. A mesma célula podia se correlacionar com posição em mais de uma condição, e isto aconteceu em alguns casos. Nas condições de gato e contexto, as correlações positivas superaram as negativas em uma proporção pouco maior que 2:1, enquanto que na novidade houve somente correlações negativas, e no registro basal as proporções ficaram mais próximas. O valor médio dos coeficientes de Spearman (ρ) para as correlações positivas durante o gato e o contexto foi moderado (0,48 e 0,52), e um pouco mais fraco para correlações negativas (-0,37 e -0,48). Estes dados estão organizados na **Tabela 3**.

O que os resultados indicam é um aumento da quantidade de correlações entre atividade celular e posição durante as condições de gato e contexto predatório. A correlação vai no sentido de aumento de atividade celular quanto mais distante do estímulo. Em contrapartida, na novidade, há o efeito oposto de aumento de correlações de atividade celular conforme maior proximidade do estímulo.

Atividade celular nas i/dlSC e posição. 23 das 44 células (52%) das i/dlSC apresentaram correlação com a posição do animal no aparato em pelo menos uma condição ($p \leq 2{,}78 \times 10^{-4}$). O número de células que apresentou correlação por condição foi: 6 células no registro basal, 2 células na novidade, 7 células durante o gato e 16 células durante o contexto. As correlações com posição foram ligeiramente

diferentes nas i/dlSC: nas condição basal houveram mais correlações negativas do que positivas (5% de todas as 44 células com correlações positivas, contra 9% com correlações negativas); na novidade, assim como na dPAG, houve somente correlações negativas; no gato as correlações positivas mantiveram-se em proporção de 2:1 em relação as negativas; e no contexto observou-se o mesmo número de células com correlações positivas e negativas. O valor médio dos coeficientes de Spearman para correlações positivas no gato e contexto também foi moderado (0,44 e 0,43) e um pouco mais fraco para correlações negativas (-0,36 e -0,41). Esses dados também estão colocados na Tabela 3.

Diferentemente da dPAG, o aumento na quantidade de correlações entre atividade e celular e posição para as células das i/dlSC, quando comparado com a condição basal, acontece somente durante o contexto predatório. A correlação também aqui vai no sentido de aumento de atividade celular conforme aumenta a distância do estímulo, com exceção da novidade. Vale notar que, apesar do número de células com correlações no gato e no registro basal ser parecido, no registro basal a proporção de correlações positivas e negativas foi de 1:2 e no gato foi de 2:1.

Tabela 3 – Correlações entre atividade celular e posição do animal no aparato

Condições Avaliadas	Células correlacionadas positivamente				Células correlacionadas negativamente			
	dPAG		i/dlSC		dPAG		i/dlSC	
	% do total de células	*média de ρ*	*% do total de células*	*média de ρ*	*% do total de células*	*média de ρ*	*% do total de células*	*média de ρ*
Basal	5%	0,36	5%	0,33	3%	-0,49	9%	-0,36
Novidade	-	-	-	-	8%	-0,37	5%	-0,45
Gato	21%	0,48	11%	0,44	8%	-0,37	5%	-0,36
Contexto	23%	0,52	16%	0,43	10%	-0,48	16%	-0,41

Para cada condição avaliada, é mostrado qual a proporção de células que se correlacionaram positivamente e negativamente com a posição do animal no aparato. Dentro de cada um desses grupos, é mostrado a quantidade de células que apresentaram correlação, como uma porcentagem do total de células da região, e o valor médio obtido do coeficiente de Spearman (ρ) para estas células que apresentaram correlação. Fonte: o autor (2018).

Atividade celular na dPAG e velocidade. 33 das 39 células (85%) na dPAG apresentaram correlação com a velocidade do animal no aparato em pelo menos uma condição. Correlações positivas indicavam que quanto maior a atividade celular, maior a velocidade do animal, correlações negativas indicavam o oposto. O número de

células que apresentou correlação por condição foi: 12 células no registro basal, 13 na novidade, 19 durante o gato e 23 durante o contexto. Em todas as condições as correlações foram principalmente positivas (26~54% das células), com correlações negativas apresentadas somente por um menor número de células (3~5%) com exceção da condição do gato, onde houve um leve aumento das correlações negativas (10%). O valor médio dos coeficientes de Spearman para correlações positivas foi moderado (0,54 até 0,6). Para as condições negativas, ele foi moderado nas condições de alto risco (-0,46 e -0,51) e mais fraco nas condições de baixo risco (-0,37 e -0,38). Estes dados estão organizados na **Tabela 4.**

Estes dados indicam que uma quantidade substancial de células da dPAG apresenta correlação da sua atividade com a velocidade do animal, com aumento de correlações durante as condições de alto risco. Notavelmente, há um leve aumento de correlações negativas entre atividade celular e velocidade durante a condição do gato.

Tabela 4 – Correlações entre atividade celular e velocidade do animal no aparato

Condições Avaliadas	Células correlacionadas positivamente				Células correlacionadas negativamente			
	dPAG		i/dlSC		dPAG		i/dlSC	
	% do total de células	*média de ρ*	*% do total de células*	*média de ρ*	*% do total de células*	*média de ρ*	*% do total de células*	*média de ρ*
Basal	26%	0,56	20%	0,46	5%	-0,37	7%	-0,45
Novidade	31%	0,60	36%	0,44	3%	-0,38	-	-
Gato	38%	0,54	41%	0,53	10%	-0,46	2%	-0,39
Contexto	54%	0,55	34%	0,51	5%	-0,51	-	-

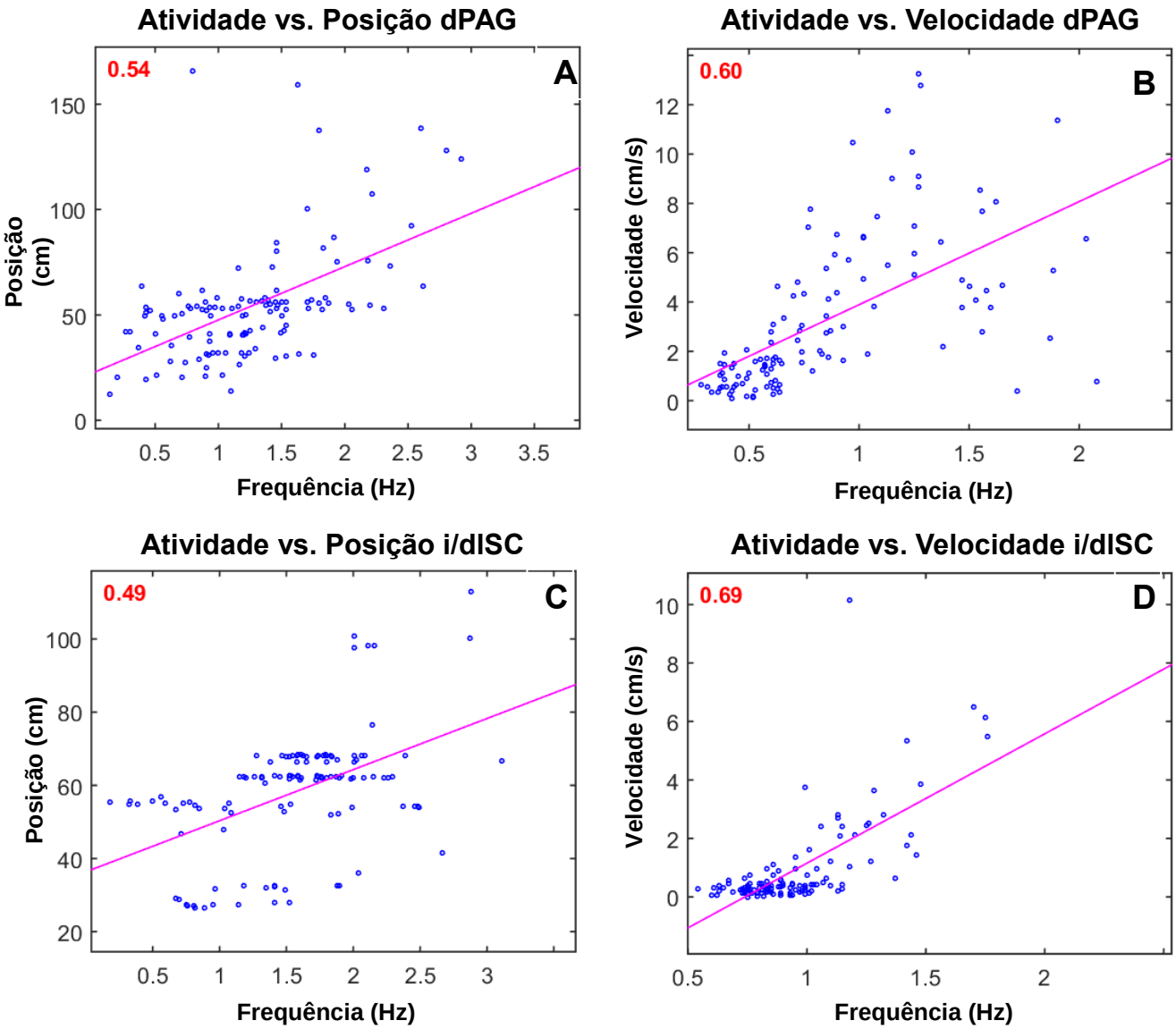
Para cada condição avaliada, é mostrado qual a proporção de células que se correlacionaram positivamente e negativamente com a velocidade do animal no aparato. Dentro de cada um desses grupos, é mostrado a quantidade de células que apresentaram correlação, como uma porcentagem do total de células da região, e o valor médio obtido do coeficiente de Spearman (ρ) para estas células que apresentaram correlação. Fonte: o autor (2018).

Atividade celular nas i/dlSC e velocidade. 29 das 44 células das i/dlSC (66%) apresentaram correlação com a velocidade do animal no aparato em pelo menos uma condição. O número de células que apresentou correlação por condição foi: 12 células no registro basal, 16 durante a novidade, 19 durante o gato e 15 durante o contexto. Em todos os casos as correlações foram principalmente positivas, com aumento no número de correlações mais visível durante o gato (41% de todas as 44 células). O

valor médio dos coeficientes de Spearman para correlações positivas foi moderado (0,46 até 0,53). Notavelmente, foram poucas as correlações negativas de forma geral, apenas 4 células do total.

As células das i/dlSC parecem mostrar uma leve preferência por condição quando correlacionadas com velocidade. Há um aumento de correlações durante o gato, tanto no número de células que se correlacionam com velocidade como no valor médio do coeficiente de Spearman. Estes dados também estão organizados na Tabela 4. A **Figura 12** traz exemplos gráficos de algumas correlações entre atividade celular e as variáveis discutidas nesta seção durante a condição do gato.

Figura 12 – Gráficos de correlação entre posição e velocidade dos animais com a atividade de quatro células distintas



Todas as correlações foram retiradas durante a condição do gato, e o valor do coeficiente de Spearman está indicado em vermelho. **A** e **B** representam células da dPAG, enquanto **C** e **D** representam células das i/dlSC. Fonte: o autor (2018).

3.2.4 Interações entre características celulares e resumo funcional das regiões

Foi verificada a existência de possíveis interações entre as características de respostas celulares para condição, comportamento, posição e velocidade, para a quarta e quinta parte do protocolo experimental, que envolviam as condições de gato e contexto. Essas duas condições foram escolhidas por evocarem maior parte da atividade celular de ambas as regiões e por serem o foco deste trabalho. O método utilizado foi o mesmo aplicado para verificar interações entre condições, o Teste Exato de Fisher, com α = 0,05. Brevemente, para a dPAG, nenhuma interação entre essas características foi verificada, tanto para o gato como para o contexto. Para as i/dlSC, durante o contexto, nenhuma interação foi verificada, e durante o gato foi visto interação positiva entre as células que respondiam ao gato e a velocidade. Isto é, uma célula que indicava a condição do gato tinha mais chance de também apresentar correlação com velocidade, e vice-versa. Esses dados estão organizados na **Tabela 5** e na **Tabela 6**, indicando a razão das chances de duas condições interagirem e o valor de *p* associado.

Tabela 4 – Chance de duas características celulares interagirem na Parte 4 do protocolo

	Gato				**Comportamento**			
	dPAG		**i/dlSC**		**dPAG**		**i/dlSC**	
	Chance	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*
Gato	-	-	-	-	3,25	0,391	0,96	1,000
Comportamento	3,25	0,391	0,96	1,000	-	-	-	-
Posição	0,57	0,478	0,91	1,000	0,46	0,655	2,33	0,369
Velocidade	0,92	1,000	**4,77**	**0,030**	1,06	1,000	2,33	0,308
	Posição				**Velocidade**			
	dPAG		**i/dlSC**		**dPAG**		**i/dlSC**	
	Chance	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*
Gato	0,57	0,478	0,91	1,000	0,92	1,000	**4,77**	**0,030**
Comportamento	0,46	0,655	2,33	0,369	1,06	1,000	2,33	0,308
Posição	-	-	-	-	0,83	1,000	0,47	0,680
Velocidade	0,83	1,000	0,47	0,680	-	-	-	-

Tabela que indica a razão da chance de duas características celulares interagirem em comparação a elas não interagirem durante a quarta parte do protocolo (exposição ao gato). Valores calculados pelo Teste Exato de Fisher. Valores em vermelhos indicam $p < 0,05$. Fonte: o autor (2018).

Tabela 5 – Chance de duas características celulares interagirem na Parte 5 do protocolo

	Contexto				Comportamento			
	dPAG		i/dISC		dPAG		i/dISC	
	Chance	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*
Contexto	-	-	-	-	1,43	0,716	0,14	0,111
Comportamento	1,43	0,716	0,14	0,111	-	-	-	-
Posição	0,86	1,000	2,31	0,220	1,87	0,447	3,79	0,117
Velocidade	0,24	0,054	0,34	0,199	3,06	0,262	2,27	0,414
	Posição				**Velocidade**			
	dPAG		**i/dISC**		**dPAG**		**i/dISC**	
	Chance	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*	*Chance*	*p-valor*
Contexto	0,86	1,000	2,31	0,220	0,24	0,054	0,34	0,199
Comportamento	1,87	0,447	3,79	0,117	3,06	0,262	2,27	0,414
Posição	-	-	-	-	3,33	0,169	0,82	1,000
Velocidade	3,33	0,169	0,82	1,000	-	-	-	-

Tabela que indica a razão da chance de duas características celulares interagirem em comparação a elas não interagirem durante a quinta parte do protocolo (exposição ao contexto predatório). Valores calculados pelo Teste Exato de Fisher. Valores em vermelhos indicam $p < 0,05$. Fonte: o autor (2018).

Resumindo todos os dados de atividade celular nesta seção, temos o seguinte perfil para cada região:

dPAG. Levando em conta o Efeito de Condição, a dPAG responde de forma mais intensa para o gato, e de forma similar para as outras condições. A resposta é vista como grande aumento de atividade em uma grande parcela das células. Parece existir interação entre as condições de gato e confinamento, gato e contexto, gato e novidade e confinamento e contexto, de modo que células que responderam a uma condição tinham mais chance de responder a outra, e vice-versa. As células da dPAG mostram aumento de correlações com TCUMs durante as condições de gato e contexto, e este aumento parece estar relacionado com uma maior resposta a comportamentos defensivos. Existe uma consistência na resposta aos TCUMs, que envolve diminuição de atividade celular para o congelamento e para comportamentos não defensivos não incluindo exploração, assim como um aumento de atividade celular para a avaliação de risco a partir do congelamento. As células da dPAG apresentaram, de forma geral, correlações positivas entre a sua atividade e a velocidade e posição do animal, com valores médios de ρ variando de fracos a moderados. As únicas exceções notáveis incluíram um leve aumento de correlações negativas com a velocidade durante o gato e a ausência de correlações positivas com a posição durante a novidade.

i/dlSC. Considerando os Efeitos de Condição, as i/dlSC respondem mais para a condição do gato, seguido do contexto, seguido das demais condições. A resposta é vista predominantemente como diminuição da atividade celular, com uma intensa diminuição durante o gato e uma diminuição um pouco menor durante o contexto. Não pareceu haver um grande aumento de correlações com TCUMs entre as condições observadas, com exceção da condição do gato, onde houve um leve aumento no número de correlações. Foi verificada uma consistência na resposta aos TCUMs de diminuição de atividade celular ao iniciar o comportamento de congelamento e outros comportamentos não defensivos não incluindo exploração, bem como aumento de atividade celular para avaliação de risco a partir do congelamento. As células das i/dlSC apresentaram correlações altamente positivas com a velocidade em todas as condições avaliadas. As correlações com a posição foram mais balanceadas, com quantidades mais próximas de correlações positivas e negativas ao longo das condições, especialmente durante o contexto quando as proporções foram idênticas. Os valores médios de ρ variaram de fracos a moderados.

4 DISCUSSÃO

4.1 Região dorsal da Matéria Cinzenta Periaquedutal (dPAG)

Em se tratando da dPAG, a literatura mostra uma consistente correlação entre a ativação desta região do tronco encefálico com a apresentação de comportamentos de defesa e outros sinais relacionados ao medo. De fato, quanto maior o grau da ameaça, maior a ativação da dPAG (CEZARIO et al., 2008), e quanto mais fortemente a dPAG é estimulada, mais intensa é a resposta defensiva observada (BITTENCOURT et al., 2004). Este tipo de resultado, a princípio, parece indicar uma relação direta entre a dPAG e a organização de comportamentos defensivos, ainda mais tendo em vista a posição estratégica da dPAG que lança projeções diretas para áreas pré-motoras do tronco cerebral (BENARROCH, 2012). No entanto, se este fosse seu único papel ou sua função principal, seria esperado encontrar forte correlação entre a mudança de atividade celular dos neurônios da dPAG e a apresentação dos comportamentos defensivos. Este estudo, somado com outros resultados mais recentes da literatura, indica que esse não parece ser o caso.

As condições experiementais. Das células investigadas na dPAG neste trabalho, 54% aumentaram de atividade durante a apresentação da ameaça predatória de forma intensa, e 10% diminuíram de atividade. Já na investigação de correlação com atividade comportamental, apenas 15% das células mostraram correlação direta com alteração de comportamento durante a ameaça predatória. De modo similar, Watson et al. (2016), trabalhando com ratos, encontraram que 63% das células da dPAG aumentavam significativamente de atividade durante os primeiros 20 segundos de exposição ao odor de um gato, mas não verificaram nenhuma correlação entre atividade da dPAG e ativação dos músculos do pescoço do animal. Já Deng, Xiao e Wang (2016), trabalhando com camundongos, demonstraram que cerca de 30% das células da dPAG alteravam seu perfil de atividade quando o animal realizava os comportamentos de fuga ou avaliação de risco. Ou seja, enquanto uma grande parte das células da dPAG alteram seu padrão de atividade diante de situações de risco, uma parte consideravelmente menor das células parece alterar este padrão diante de mudanças comportamentais.

A partir desses resultados, nós sugerimos que **a dPAG é, em primeiro lugar, um sinalizador do estado de risco em que o animal se encontra**. A alta ativação das unidades da dPAG frente as ameaças à sobrevivência do organismo é uma forma de preparar o animal para a geração das respostas adequadas. A dPAG também parece ter um papel na organização destas respostas na forma da apresentação dos comportamentos de defesa, mas é uma proporção menor das células desta região que parecem estar envolvidas com tal função. Assim, a dPAG tanto atua como sinalizadora (primariamente) de um estado de risco como organizadora (secundariamente) das respostas defensivas adequadas. Essas funções aparentam ser independentes, dada a ausência de interação entre as características de resposta ao gato ou ao contexto com o comportamento.

Notavelmente, consideramos neste estudo dois parâmetros distintos para verificar o efeito de uma dada condição: a quantidade de células recrutadas e a mediana da variação média da atividade destas células. Usando esses parâmetros, conseguimos delinear uma diferença clara entre a condição do gato e as demais condições. No entanto, usando estes mesmos parâmetros, não conseguimos ver um destaque da condição do contexto das demais condições de baixo risco (confinamento e novidade), apesar da clara mudança que é verificada no repertório comportamental do animal nesta condição que indica a presença de medo (maior presença de comportamentos de defesa). Uma explicação possível para isso é que a dPAG atuaria principalmente como sinalizadora de risco claro e imediato, e o contexto é uma situação de risco ambígua. Isto justificaria a menor ativação da região, talvez até em níveis comparáveis com a situação do confinamento ou de novidade. Outra explicação possível é que a escolha de parâmetros deve ser feita de outra forma a fim de verificar um papel maior da dPAG no contexto em relação ao confinamento ou novidade. Há ainda uma terceira possibilidade, em que se reconhece que a situação de confinamento e de novidade, consideradas como situações de baixo risco para o animal, talvez não o sejam de fato. Isso será discutido em mais detalhes abaixo.

Em se tratando das interações entre as diferentes condições experimentais para as células da dPAG, foram notadas interações entre: (i) a condição de confinamento com a condição do gato e com a condição do contexto; (ii) interação entre a condição de novidade com a do gato; e (iii) interação da condição de gato com o contexto. Este tipo de interação indica que uma célula que disparou para uma destas condições teria mais chance de disparar para outra. Uma explicação para isso seria

um processo de facilitação do disparo da célula mediante potenciação, como visto para a amígdala em paradigmas de condicionamento do medo (MCKERNAN; SHINNICK-GALLAGHER, 1997). A interação entre o gato e o contexto predatório era esperada neste trabalho. Esta interação indica que as células responsáveis por sinalizar o estado de risco do predador tem mais chances de sinalizar o estado de risco do contexto predatório, reforçando a ideia de que são células sinalizadoras de risco. As demais interações, contudo, requerem maior aprofundamento para explicar.

No caso do confinamento, esta condição foi inicialmente incorporada ao protocolo como um controle não associado a respostas de medo, mas esta percepção pode ter sido equivocada. Na literatura de comportamentos defensivos, um dos paradigmas de estudo é o bloqueio de rota de fuga, em que o animal é confrontado com um estímulo ameaçador (um coespecífico agressivo, por exemplo), mas suas rotas de fuga estão bloqueadas. Isto produz no animal comportamentos de defesa compensatórios, como evitar contato com o agressor e iniciar posturas de congelamento (TAYLOR et al., 2011). É possível que, ao confinar o animal a um espaço menor do aparato, ainda que em um ambiente familiar, essa alteração por si só produza alguma apreensão no animal devido ao bloqueio de uma rota de fuga em potencial, mesmo que nenhum estímulo ameaçador esteja presente. Parte desse efeito poderia alterar a atividade na dPAG, pois sabe-se que células desta região são ativadas quando o animal é colocado em contenção física, em paradigmas de estudo de estresse (FOGAÇA et al., 2012). Apesar do confinamento no espaço menor não ser equivalente a um estado de contenção, ainda é plausível que ele seria sinalizado pela dPAG como um estado maior de risco.

Essa hipótese de confinamento como um estado de risco explicaria a interação entre as células de confinamento com as células do gato e do contexto – todas estariam codificando o mesmo tipo de informação. Ela também explicaria o fato do efeito de condição medido para o contexto predatório ser similar ao efeito de condição medido para o confinamento. No entanto, vale ressaltar que o número de células que mudou de atividade no confinamento foi a menor entre todas as condições, e que não foram observados comportamentos compensatórios entre os animais que ficaram confinados a um espaço menor do aparato. Isto parece indicar que, caso o confinamento seja um estado de risco sinalizado pela dPAG, ele não provoca as mesmas respostas de defesa.

A interação entre a novidade, que incluía um brinquedo de pelúcia e o odor de baunilha, com o gato pode ser justificada por linhas semelhantes. O odor de baunilha é usado comumente como pista ambiental neutra em testes de condicionamento de medo de ratos (CURZON, RUSTAY, BROWNMAN, 2009; ARCHBOLD; BOUTON; NADER, 2010), e camundongos não parecem evitá-lo (WANG et al., 2013). De modo similar, objetos novos colocados no ambiente de ratos não induzem as respostas de medo verificadas para, por exemplo, predadores, mas ainda causam uma pequena quantidade de aversão. Isto porque roedores de forma geral apresentam neofobia – um medo inato a estímulos novos, como objetos e cheiros (MISSLIN, 2003). Esse tipo medo pode justificar a interação observada aqui entre resposta para a novidade e para o gato, bem como justificar o fato do efeito da condição para o contexto predatório ter sido similar ao efeito da novidade: a introdução da novidade levou a uma sinalização de medo na dPAG. No entanto, vale ressaltar novamente que não foram observados comportamentos defensivos durante esta condição, o que indica que, se este é um estado de risco, ele não provoca as mesmas respostas de defesa que o gato ou o contexto.

Os comportamentos, a velocidade e a posição. Acerca do comportamento geral da dPAG durante as TCUMs, como já foi discutido, pode-se dizer que a proporção de células da dPAG que responde a alterações comportamentais parece ser bem inferior a que responde ao estado de risco que o animal se encontra, especialmente durante condições sem ameaças predatórias (em torno de 3~5% de mudança de atividade para TCUMs na condição basal, de confinamento e de novidade, com aumento para 15% durante o gato e 23% durante o contexto). A implicação imediata desses dados é que uma certa proporção de células da dPAG estaria coordenando os comportamentos defensivos observados nas condições de maior risco. Se este for o caso, entretanto, o mecanismo específico de controle motor ainda precisa ser desvendado, pois não parece haver na literatura estudos que mostram correlação entre mudança na atividade celular da dPAG e alterações em regiões de controle ou resposta motora. Koutsikou et al. (2014) demonstraram que ativação da região ventrolateral da PAG (vlPAG) de ratos facilita a ativação de motoneurônios alfa, e Tovote et al. (2016), trabalhando com a vlPAG em camundongos, demonstrou que a ativação de neurônios desta região que se projetavam para o núcleo magnocelular do bulbo raquidiano (relacionado com controle motor) causava uma forte resposta de

congelamento no animal. Se estes resultados puderem ser estendidos para a dPAG, este seria o elo causal necessária para conectar a alteração da atividade celular nesta região com a mudança no comportamento do animal. Dito isso, enquanto que Watson et al. (2016) encontraram correlação entre mudança na atividade da vlPAG e atividade no EMG de músculos do pescoço de ratos (um indicador de congelamento), tal correlação não foi encontrada para a dPAG. Isto parece indicar que as conexões observadas para a vlPAG em relação a respostas motoras não podem ser generalizadas para a dPAG.

Adicionalmente, este trabalho demonstrou que não há um único comportamento específico com o qual a mudança de atividade na dPAG está relacionada. Enquanto que o aumento da responsividade a TCUMs nesta região parece estar relacionado com a maior execução de comportamentos defensivos em situações de alto risco, resultados significativos de alteração celular foram encontrados tanto para a iniciação de comportamentos não defensivos (como exploração, presente em várias condições) quanto para todos os tipos de comportamentos defensivos considerados (avaliação de risco, congelamento e fuga, presentes durante a condição de gato e contexto). Este resultado parece estar ao menos parcialmente de acordo com outros resultados da literatura. Já foram demonstradas relações entre atividade da dPAG e comportamentos de avaliação de risco, congelamento e, especialmente, comportamentos de fuga (VIANNA; LANDEIRA-FERNANDEZ; BRANDÃO, 2001b; BITTENCOURT et al., 2004; DENG; XIAO; WANG, 2016; EVANS et al., 2018). No entanto, as correlações entre atividade na dPAG e comportamentos não defensivos encontradas neste trabalho não parecem ter sido exploradas na literatura.

Além disso, também foi encontrado um padrão consistente de mudança de atividade celular quando na iniciação dos comportamentos de congelamento e comportamentos não-defensivos que excluíam exploração (redução da atividade celular), assim como da avaliação de risco iniciada a partir de congelamento (aumento de atividade celular). Esta observação coloca em questão se os resultados observados não são produtos de uma correlação entre atividade celular e velocidade do animal, dado que tanto o congelamento quanto os comportamentos não defensivos estão associados a redução de velocidade a partir de outros comportamentos em que o animal apresentava atividade motora maior (como exploração e avaliação de risco). O mesmo vale para o aumento de atividade observado na iniciação da avaliação de

risco, que parte principalmente a partir de um comportamento com menos movimentação (congelamento). Dito isso, não foi encontrada interação entre as células do comportamento e as células de velocidade, tanto durante a condição do gato quanto durante o contexto, o que indica que esta resposta não é meramente resultado da variação da velocidade do animal, mas sim da seleção de um novo comportamento a ser iniciado.

A correlação entre frequência de disparo celular e velocidade linear já foi descrita na literatura para diferentes regiões do encéfalo, tais como o hipocampo, o septo medial e o hipotálamo (WIENER; PAUL; EICHENBAUM, 1989; TSANOV, 2017). De fato, este estudo encontrou uma proporção razoável de células na dPAG que apresentaram correlação com velocidade, variando de 31% durante o registro basal até 59% durante a condição o contexto. As médias dos coeficientes de Spearman para essas correlações indica que elas variaram de fracas para moderadas, de acordo com o critério proposto por Evans (1996). Deng, Xiao e Wang (2016), investigando a relação entre velocidade linear e atividade neuronal na dPAG, não encontraram correlação entre atividade celular e velocidade instantânea, mas encontraram correlação entre atividade celular média durante um episódio de fuga e velocidade máxima atingida pelo animal. Este estudo não indica que a mudança consistente no padrão de atividade celular vista durante os comportamentos está relacionada com a velocidade, mas indica que uma considerável porção das células da região possui correlação com esta variável.

No que tange a relação entre atividade das células da dPAG e posição do animal no aparato, as proporções de células que mostraram interações significativas foi menor que para outras variáveis avaliadas, tais como velocidade e condição experimental. No caso, durante o registro basal e novidade, as proporções ficaram em torno de 8%, aumentando durante o gato e o contexto para 29-33%. Isto indica que esta variável não parece ser tão relevantemente codificada na dPAG. Notavelmente, durante a novidade, houveram somente células com correlação negativa em relação a posição. Isto indica que um estímulo novo aumentou ligeiramente a atividade celular do animal quando ele estava próximo, em contraste com as outras condições observadas em que a maior distância do estímulo ameaçador levava a um aumento da atividade celular (mais correlações positivas). Apesar desse dado interessante, a proporção de células que apresentaram tal correlação foi baixa.

4.2 Camadas intermediárias e profundas do Colículo Superior (i/dlSC)

Entre as décadas de 60 e 80 diversos estudos já haviam sido acumulados mostrando que estimulações elétricas do colículo superior levavam não só a movimentos de orientação em direção a um estímulo visual, mas também a movimentos de escape e fuga (SAHIBZADA; DEAN; REDGRAVE, 1986). De fato, foi com base no acúmulo dessas evidências que Dean, Redgrave e Westby (1989) propuseram que as i/dlSC coordenavam dois tipos de resposta: comportamentos de perseguição e comportamentos de defesa. Estudos mais recentes indicam que esta visão da dupla funcionalidade das i/dlSC mostrou-se correta, pois um outro nível de segregação funcional foi encontrado: em ratos, as regiões laterais das i/dlSC coordenam os comportamentos de perseguição e caça, enquanto as regiões mediais coordenam os comportamentos defensivos (FURIGO et al., 2010; COMOLI et al., 2012). Estudos em primatas confirmaram a generalidade evolutiva do papel das i/dlSC em respostas de defesa, pois danos nesta região em macacos capuchinhos inibiu respostas a um estímulo ameaçador (MAIOR et al., 2011), e estimulação química da região em macacos nemesterianos levou a comportamentos de fuga e escape (DESJARDIN et al., 2013). Importantemente, neste último estudo, as respostas foram obtidas tanto com estimulação medial quanto com estimulação lateral das i/dlSC, sugerindo que a segregação anátomo-funcional das i/dlSC observada em ratos não pode ser generalizada.

As condições experimentais. Como pode ser visto em nossas lâminas histológicas, nossa coleta de dados nas i/dlSC atingiu somente a região medial envolvida com os comportamentos de defesa, justificando a intepretação destes dados como relevantes para a situação de perigo. Quando olhamos para os Efeitos da Condição calculados para as i/dlSC, que envolvem os parâmetros de quantidade de células recrutadas e a mediana da variação média da atividade destas células, observamos que o destaque maior é observado nas células que diminuem de atividade: 39% das células reduzem de atividade durante o gato, com mediana de variação de intensidade de 0,21; e 18% durante o contexto, com mediana de 0,37. Isso indica uma inibição forte e moderada das células das i/dlSC durante as condições de alto risco, respectivamente. A partir desses resultados, nossa proposta é que **as i/dlSC são primariamente inibidas**

durante uma situação de alto risco, a fim de descartar informações ambientais irrelevantes.

Como já foi colocado na introdução deste trabalho, o colículo superior é uma estrutura neuroanatômica que recebe sinais auditivos, visuais e somestésicos transmitidos por diversas outras regiões, tais como o hipotálamo e o núcleo do nervo trigeminal (HUERTA; HARTING, 1984). Em uma situação de risco como um encontro com o predador, é importante que todas as informações não relevantes à sobrevivência do organismo sejam bloqueadas, de modo que o animal se concentre apenas em organizar sua resposta de defesa. Esse modelo explicaria a forte inibição observada durante a condição do gato para as células que reduziram de atividade. O mesmo pode ser observado, embora em menor intensidade, durante o contexto predatório. Em suporte à sugestão de que tais células são inibidas como resposta ao estado de risco, foi verificado que a única interação entre condições nas i/dlSC foi entre o gato e o contexto, indicando que as células que responderam significativamente para uma condição também o faziam para a outra.

Os comportamentos, a velocidade e a posição. Já é sabido que as i/dlSC projetam-se diretamente para áreas de controle motor no tronco cerebral e na medula espinhal, como por exemplo via o trato tecto-espinal, que controla movimento da cabeça e dos olhos (SPARKS; HARTWITCH-YOUNG, 1989). Adicionalmente, Vargas, Marques e Schenberg (2000) demonstraram que estimulações elétricas das i/dlSC eram tão eficazes quanto estimulações da dPAG para induzir comportamentos defensivos. Entretanto, Bittencourt et al. (2005) encontraram uma eficácia menor na indução de respostas defensivas via i/dlSC quando comparadas com dPAG, mas ainda sim obteve respostas de congelamento e fuga ao estimular as camadas do colículo. Finalmente, Evans et al. (2018) mostraram que inativação optogenética da dPAG diante de uma ameaça do tipo “sombra iminente” eliminava respostas de fuga, mas ainda mantinha congelamento, enquanto inibição das i/dlSC abolia qualquer tipo de resposta defensiva em dois terços dos casos.

Este conjunto de evidências anatômicas, estudos de estimulação e estudos de lesão indicam que as i/dlSC são direta ou indiretamente responsáveis pela coordenação de comportamentos defensivos. De fato, neste estudo, encontramos que 41% das células das i/dlSC respondiam significativamente a pelo menos uma das TCUMs em pelo menos uma das condições experimentais. Adicionalmente, esta

mudança de atividade celular diante de uma mudança de comportamento parece ocorrer quase independentemente da condição experimental, dado que 14 das 18 células que responderam a TCUMs o fizeram em mais de uma condição experimental, e as proporções de resposta por condição foram parecidas (16~18% de células respondendo por condição, com exceção do gato onde houve ligeiro aumento para 27%). Essa é uma diferença marcante entre as i/dlSC e a dPAG: para a primeira região, as células que respondem a alterações comportamentais não parecem sensíveis ao estado que o animal se encontra, enquanto para a segunda há aumento considerável na proporção de células responsivas a TCUM durante o gato e o contexto.

Em relação a quais TCUMs especificamente as células das i/dlSC parecem estar envolvidas, nenhum padrão claro emergiu dos dados, com exceção talvez de uma prevalência de resposta à iniciação da avaliação de risco durante o contexto (59% das TCUMs dessa condição). Já em relação à maneira como a atividade celular mudou em uma dada TCUM, foi encontrado o mesmo padrão da dPAG: se o animal iniciava o comportamento de congelamento ou algum outro comportamento não-defensivo excluindo exploração, as células das i/dlSC tendiam a diminuir de atividade, consistentemente; e se o animal iniciava avaliação de risco a partir de congelamento, as células tendiam a aumentar de atividade. Novamente pode ser levantada a questão se a mudança de atividade celular em uma TCUM na realidade está relacionada com mudança na velocidade do animal, e não necessariamente com o novo comportamento executado. No entanto, assim como na dPAG, também não foi verificada interação entre as células que se correlacionam com velocidade e as células de comportamento.

As células das i/dlSC que respondem significativamente à mudança de velocidade, quando comparadas a dPAG, estão em proporção menor, variando de 25% na condição basal até 43% na condição do gato. As médias dos coeficientes de Spearman também foram menores de maneira geral tanto para as correlações positivas quanto negativas, mas as correlações ainda sim foram verificadas. Vale notar que houve interação entre esta variável e a condição do gato para as i/dlSC, indicando que as células que as células que respondiam ao gato tinham mais chance de se correlacionar com a velocidade.

Finalmente, resta a questão da resposta das células das i/dlSC em relação à posição do animal no aparato. Essa é uma questão interessante porque Redgrave e

Dean (1991) propuseram que seria as i/dlSC quem poderiam estar informando sobre a distância predatória para a dPAG, de modo a influenciar no comportamento do animal. Nosso estudo encontrou, em termos absolutos, uma baixa proporção de células cuja atividade se correlacionava com a posição nas i/dlSC: 14% das células apresentaram correlação durante o registro basal, 5% durante a novidade, 16% durante o gato e 32% durante o contexto. As médias dos coeficientes de Spearman foram fracas (valores entre 0,33 e 0,45). Vale notar que a proporção relativa de fato aumentou durante o contexto, a condição de risco ambígua. No entanto, não verificamos interação entre as variáveis de posição com as condições de alto risco, nem com o comportamento. Tomando esses dados em conjunto, não encontramos evidências convincentes de que esta região codifique a distância do predador.

5 CONCLUSÃO

A matéria cinzenta periaquedutal dorsal (dPAG) aumenta fortemente de atividade durante a exposição ao predador, sendo esta atividade medida pelo número de células recrutadas e pela variação nas suas frequências de disparo. Este aumento de atividade é interpretado neste trabalho como sinalização da presença da ameaça predatória. Ela também aumenta de intensidade diante de outros estímulos, como confinamento do animal, apresentação a uma novidade ou apresentação ao contexto predatório. Essa variação também é interpretada como sinalização de ameaça, embora em nível menor. Além disso, uma porção menor das células da dPAG estão correlacionadas com mudança de comportamento no animal. Esta mudança é interpretada como um papel na organização da resposta motora, especialmente das respostas motoras de defesa.

As camadas intermediárias e profundas do colículo superior (i/dlSC) contam com um grupo de células que diminui consideravelmente de atividade diante do predador, e diminuem um pouco menos de atividade durante o contexto predatório. Essa diminuição é interpretada como uma inibição das i/dlSC afim de reduzir a captação de pistas ambientais irrelevantes para lidar com a situação de risco em questão. Enquanto as i/dlSC possuem correlação com a mudança comportamental do animal, esta correlação não parece vinculada especificamente com a organização de comportamentos de defesa.

REFERÊNCIAS[1]

AMANO, K.; TANIKAWA, T.; KAWAMURA, H.; ISEKI, H.; NOTANI, M.; KAWABATAKE, H.; SHIWAKU, T.; SUDA, T.; DEMURA, H.; KITAMURA, K. Endorphins and pain relief: further observations on electrical stimulation of the lateral part of the periaqueductal gray matter during rostral mesencephalic reticulotomy for pain relief. **Applied Neurophysiology**, v. 45, n. 1-2, p. 123-135, 1982.

ARCHBOLD, G. E.; BOUTON, M. E.; NADER, K. Evidence for the persistence of contextual fear memories following immediate extinction. **The European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 7, p. 1303-1311, 2010.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends in Neurosciences**, v. 17, n. 9, p. 379-389, 1994.

BARRETT, H. C. Adaptations to predators and prey. In: BUSS, D. M. (Ed.). **The handbook of evolutionary psychology**. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2015. cap. 9, p-246-263.

BELY, A. E.; NYBERG, K. G. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 3, p. 161-170, 2010.

BENARROCH, E. Periaqueductal gray: an interface for behavioral control. **Neurology**, v. 78, n. 3, p. 210-217, 2012.

BENGTSON, S. Origins and early evolution of predation. In: KOWALEWSKI, M.; KELLEY, P. H. (Eds.). **The Fossil Record of Predation**. Pittsburgh: The Paleontological Society, 2002. p. 289-317.

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

BITTENCOURT, A. S.; NAKAMURA-PALACIOS, E. M.; MAUAD, H.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L. C. Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to the periaqueductal gray matter of the rat. **Neuroscience**, v. 133, n. 4, p. 873-892, 2005.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Defensive behaviors, fear and anxiety. In: GRIEBEL, G.; NUTT, D. J. (Eds.). **Handbook of anxiety and fear**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2008. cap. 2.4, p.63-79.

[1] De acordo com ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: Referências: Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

BLANCHARD, D. C.; WILLIAMS, G.; LEE, E. M. C.; Blanchard, R. J. Taming of wild Rattus norvegicus by lesions of the mesencephalic central gray. **Physiological Psychology**, v. 9, n. 2, p. 157-163, 1981.

BOISSY, A. Fear and fearfulness in animals. **Quarterly Review of Biology**, v. 70, n. 2, p. 165-191, 1995.

BUZSÁKI, G. Large-scale recording of neuronal ensembles. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 446-451, 2004.

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

CANTERAS, N. S.; SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 360, n. 2, p. 213-245, 1995.

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

CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 21, p. 10089-10093, 1992.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. **Behavioural Brain Research**, v. 58, n. 1-2, p. 27-47, 1993.

CÄSAR, C.; ZUBERBÜHLER, K.; YOUNG, R. J.; BYRNE, R. W. Titi monkey call sequences vary with predator location and type**. Biology Letters**, v. 9, n. 9, p. 20130535, 2013.

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

CHOI J. M.; KIM, S. S.; CHOI, C. I.; CHA, H. L.; OH, H. H.; GHIL, S.; LEE, Y. D.; BIRNBAUMER, L.; SUH-KIM, H. Development of the main olfactory system and main olfactory epithelium-dependent male mating behavior are altered in G_o-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 39, p. 10974-10979, 2016.

COMOLI, E.; DAS NEVES FAVARO, P.; VAUTRELLE, N.; LERICHE, M.; OVERTON, P. G.; REDGRAVE, P. Segregated anatomical input to subregions of the rodent superior colliculus associated with approach and defense. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 6, n. 9, p. 1-19, 2012.

COURNOYER, B. L.; COHEN, J. H. Cryptic coloration as a predator avoidance strategy in seagrass arrow shrimp colormorphs. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 402, n. 1-2, p. 27-34, 2011.

CURZON, P.; RUSTAY, N. R.; BROWNMAN, K.E.; Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. In: BUCAFFUSCO, J. J. (Ed.). **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2009. cap. 2.

DAWKINS, R.; KREBS, J. R. Arms races between and within species. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 205, n. 1161, p. 489-511, 1979. Series B, Biological Sciences.

DE FRANCESCHI, G.; VIVATTANASARN, T.; SALEEM, A. B.; SOLOMON, S. G. Vision Guides Selection of Freeze or Flight Defense Strategies in Mice. **Current Biology**, v. 26, n. 16, p. 2150-2154, 2016.

DEAN, P.; REDGRAVE, P.; WESTBY, G. W. M. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. **Trends in Neuroscience**, v. 12, n. 4, p. 137-147, 1989.

DENG, H.; XIAO, X.; WANG, Z. Periaqueductal gray neuronal activities underlie different aspects of defensive behaviors. **The Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 29, p. 7580–7588, 2016.

DESJARDIN, J. T.; HOLMES, A. L.; FORCELLI, P. A.; COLE, C. E.; GALE, J. T.; WELLMAN, L. L.; GALE, K., MALKOVA, L. Defense-like behaviors evoked by pharmacological disinhibition of the superior colliculus in the primate. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 1, p.150-155, 2013.

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, n. 4, p. 1085-1097, 2001.

DOUBELL, T. P.; SKALIORA, I.; BARON, J., KING, A. J. Functional connectivity between the superficial and deeper layers of the superior colliculus: an anatomical substrate for sensorimotor integration. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 16, p. 6596-6607, 2003.

EVANS, D. A.; STEMPEL, A. V.; VALE, R.; RUEHLE, S.; LEFLER, Y.; BRANCO, T. A synaptic threshold mechanism for computing escape decisions. **Nature**, v. 558, p. 590-594, 2018.

EVANS, J. D. **Straightforward Statistics for the Behavioral Sciences**. Pacific Grove: Brooks-Cole Publishing, 1996.

FANSELOW, M. S. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. **Psychonomic Bulletin & Review**, v. 1, n. 4, p. 429-438, 1994.

FEINSTEIN, J. S.; ADOLPHS, R.; DAMASIO, A.; TRANEL, D. The human amygdala and the induction and experience of fear. **Current Biology**, v. 21, n. 1, 34-38, 2011.

FOGAÇA, M. V.; LISBOA, S. F.; AGUIAR, D. C.; MOREIRA, F. A.; GOMES, F. V.; CASAROTTO, P. C.; GUIMARÃES, F. S. Fine-tuning of defensive behaviors in the dorsal periaqueductal gray by atypical neurotransmitters. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 357-365, 2012.

FURIGO I. C.; DE OLIVEIRA, W. F.; DE OLIVEIRA, A. R.; COMOLI, E.; BALDO, M. V. C.; MOTA-ORTIZ S. R.; CANTERAS, N. S. The role of superior colliculus in predatory behavior. **Neuroscience**, v. 165, n. 1, p. 1-15, 2010.

FUSTER, J. M. Network memory. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 10, p. 451-459, 1997a.

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

HUERTA, M. F.; HARTING, J. K. Connectional organization of the superior colliculus. **Trends in Neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 286-289, 1984.

HUNTLEY, J. W.; KOWALEWSKI, M. Strong coupling of predation intensity and diversity in the Phanerozoic fossil record. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 38, p. 15006-15010, 2007.

KANG, N.; BAUM, M. J.; CHERRY, J. A. A direct main olfactory bulb projection to the 'vomeronasal' amygdala in female mice selectively responds to volatile pheromones from males. **European Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 624-634, 2009.

KIM, E. J.; HOROVITZ, O.; PELLMAN, B. A.; TAN, L. M.; LI, Q.; RICHTER-LEVIN, G.; KIM, J. J. Dorsal periaqueductal gray-amygdala pathway conveys both innate and learned fear responses in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 36, p. 14795-14800, 2013.

KLÜVER, H.; BUCY, P. C. Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. **Archives of Neurology and Psychiatry**, v. 42, n. 6, p. 979-1000, 1939.

KOUTSIKOU, S.; CROOK, J. J.; EARL, E. V.; LEITH, J. L.; WATSON, T. C.; LUMB, B. M.; APPS, R. Neural substrates underlying fear-evoked freezing: the periaqueductal grey-cerebellar link. **Journal of Physiology**, v. 592, n. 10, p. 2197-2213, 2014.

LIEBMAN, J. M.; MAYER, D. J.; LIEBESKIND, J. C., Mesencephalic central gray lesions and fear-motivated behavior in rats. **Brain Research**, v. 23, n. 3, p. 353-370, 1970.

LIMA, S. L.; DILL, L. M. Behavioural decisions made under the risk of predation. **Canadian Journal of Zoology**, v. 68, n. 4, p. 619-640, 1990.

LOVECRAFT, H. P. Supernatural Horror in Literature. **The Recluse**, n. 1, p. 23-59, 1927.

MAIOR, R. S.; HORI, E.; BARROS, M.; TEIXEIRA, D. S.; TAVARES, M.C.; ONO, T.; NISHIJO, H.; TOMAZ, C. Superior colliculus lesions impair threat responsiveness in infant capuchin monkeys. **Neuroscience Letters**, v. 504, n. 3, p. 257-260, 2011.

MANSER, M. B.; SEYFARTH, R. M.; CHENEY, D. L. Suricate alarm calls signal predator class and urgency. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 6, n. 2, p. 55-57, 2002.

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.

MASINI, C. V.; GARCIA, R. J.; SASSE, S. K.; NYHUIS, T. J.; DAY, H. E.; CAMPEAU, S. Accessory and main olfactory systems influences on predator odor-induced behavioral and endocrine stress responses in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 207, n. 1, p. 70-77, 2010.

MAY, P. J. The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. **Progress in Brain Research**, v. 151, p. 321-378, 2005.

MCKERNAN, M. G.; SHINNICK-GALLAGHER, P. Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. **Nature**, v. 390, n. 6660, p. 607-611, 1997.

MISSLIN, R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. **Clinical Neurophysiology**, v. 33, n. 2, p. 55-66, 2003.

PAPES, F.; LOGAN, D. W.; STOWERS, L. The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 692-703, 2010.

PESSOA, L.; ADOLPHS, R. Emotion processing and the amygdala: from a “low road” to “many roads” of evaluating biological significance, **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 11, p. 773-783, 2010.

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. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 374, n. 3, p. 387-420, 1996.

REDGRAVE, P. & DEAN, P. Does the PAG learn about emergencies from the superior colliculus? In: DEPAULIS A.; BANDLER, R. (Eds.). **The midbrain periaqueductal gray matter**. New York: Plenum Press, 1991. p. 199-209.

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

RUFINO, R. A. **Investigação da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na organização das respostas de defesa frente ao predador**. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 2016.

SAHIBZADA, N.; DEAN, P.; REDGRAVE, P. Movements resembling orientation or avoidance elicited by electrical stimulation of the superior colliculus in rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 723-733, 1986.

SALEEM, M.; FETZER, I.; DORMANN, C. F.; HARMS, H.; CHATZINOTAS, A. Predator richness increases the effect of prey diversity on prey yield. **Nature Communications**, v. 3, n. 1305, p. 1-7, 2012.

SCALIA, F.; WINANS, S. S. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 161, n. 1, p. 31-55, 1975.

SILVA, B. A.; GROSS, C. T.; GRAFF, J. The neural circuits of innate fear: detection, integration, action, and memorization. **Learn & Memory**, v. 23, n. 10, p. 544-555, 2016.

SKULTETY, F. M. Stimulation of periaqueductal gray and hypothalamus. **Archives of Neurology**, v. 9, p. 608-620, 1963.

SPARKS, D. L.; HARTWICH-YOUNG, R. The deep layers of the superior colliculus. In: WURTZ, R. H.; GOLDBERG, M. E. (Eds.). **The neurobiology of saccadic eye movements**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p 213-255.

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

SWANSON, L. W. **Brain Maps: Structure of the Rat Brain**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2004.

SWANSON, L. W.; PETROVICH, G. D. What is the amygdala? **Trends in Neuroscience**, v. 21, n. 8, p. 323–331, 1998.

TAYLOR, P. J.; GOODING, P.; WOOD, A. M.; TARRIER, N. The role of defeat and entrapment in depression, anxiety, and suicide. **Psychological Bulletin**, v. 137, n. 3, p. 391-420, 2011.

TOMAZ, C.; BRANDÃO, M.; BAGRI, A.; CARRIVE, P.; SCHMITT, P. Flight behavior induced by microinjection of GABA antagonists into periventricular structures in detelencephalated rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 30, n. 2, p. 337-342, 1988.

TOVOTE, P.; ESPOSITO, M. S.; BOTTA, P.; CHAUDUN, F.; FADOK, J. P.; MARKOVIC, M.; WOLFF, S. B. E.; RAMAKRISHNAN, C.; FENNO, L.; DEISSEROTH, K.; HERRY, C.; ARBER, S.; LÜTHI, A. Midbrain circuits for defensive behavior. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 206-212, 2016.

VARGAS, L. C.; MARQUES, T. A.; SCHENBERG, L. C. Micturition and defensive behaviors are controlled by distinct neural networks within the dorsal periaqueductal

gray and deep gray layer of the superior colliculus of the rat. **Neuroscience Letters**, v. 280, n. 1, p. 45-48, 2000.

VIANNA, D. M.; GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Defensive freezing evoked by electrical stimulation of the periaqueductal gray: comparison between dorsolateral and ventrolateral regions. **Neuroreport**, v. 12, n. 18, p. 4109-4112, 2001a.

VIANNA, D. M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M. L. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 711-719, 2001b.

WANG, L.; CHEN, I. Z.; LIN, D. Collateral pathways from the ventromedial hypothalamus mediate defensive behaviors. **Neuron**, v. 85, n. 6, p. 1344-1358, 2015.

WANG, M. E.; FRAIZE, N. P.; YIN, L.; YUAN, R. K.; PETSAGOURAKIS, D.; WANN, E. G.; MUZZIO, I. A. Differential roles of the dorsal and ventral hippocampus in predator odor contextual fear conditioning. **Hippocampus**, v. 23, n. 6, p. 451-456, 2013.

WATSON, C.; KIRKCALDIE, M.; PAXINOS, G. **The Brain: An Introduction to Functional Neuroanatomy**. London: Academic Press, 2010.

WATSON, T. C.; CERMINARA, N. L.; LUMB, B. M.; APPS, R. Neural correlates of fear in the periaqueductal gray. **The Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 50, p. 12707-12719, 2016.

WEI, P.; LIU, N.; ZHANG, Z.; LIU, X.; TANG, Y.; HE, X.; WU, B.; ZHOU, Z.; LIU, Y.; LI, J.; ZHANG, Y.; ZHOU, X.; XU, L.; CHEN, L.; BI, G.; HU X.; XU, F.; WANG, L. Processing of visually evoked innate fear by a non-canonical thalamic pathway. **Nature Communications**, v. 6, n. 6756, p. 1-12, 2015.

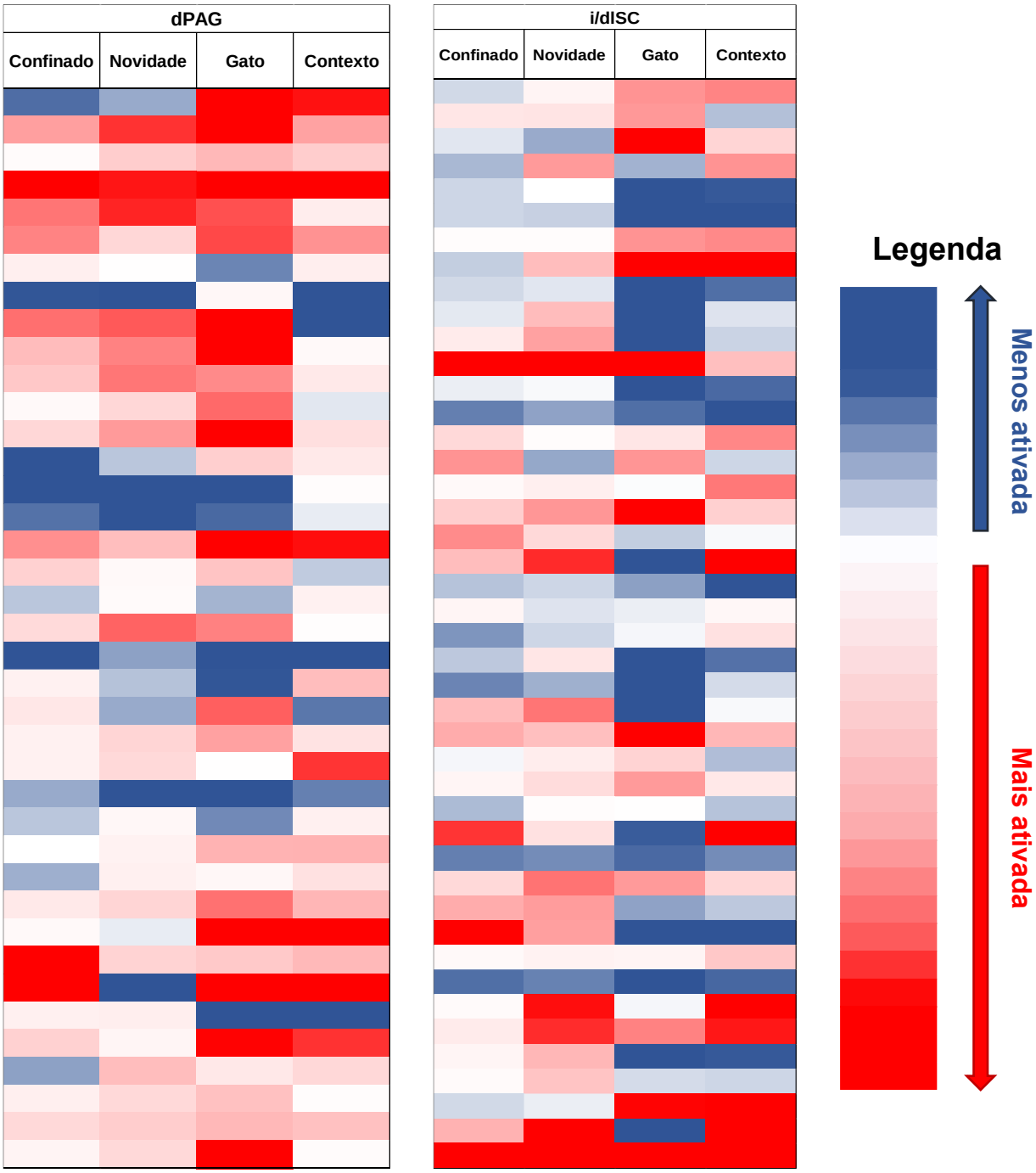
WIENER, S. I.; PAUL, C. A.; EICHENBAUM, H. Spatial and behavioral correlates of hippocampal neuronal activity. **The Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 8, p. 2737-2763, 1989.

ZIMMERMAN, J. M.; RABINAK, C. A.; MCLACHLAN, I. G.; MAREN, S. The central nucleus of the amygdala is essential for acquiring and expressing conditional fear after overtraining. **Learning & Memory**, v. 14, n. 9, p. 634-644, 2007.

ZINTZEN, V.; ROBERTS, C. D.; ANDERSON, M. J.; STEWART, A. L.; STRUTHERS, C. D.; HARVEY, E. S. Hagfish predatory behaviour and slime defence mechanism. **Scientific Reports**, v. 1, n. 131, p. 1-6, 2011.

APÊNDICE A – *Heat map* da variação da atividade celular por condição

Figura 13 – Variação média da atividade de cada célula da dPAG e das i/dlSC por condição



Esta figura mostra os heat maps para a dPAG e as i/dlSC. Cada linha de um heat map indica uma célula diferente, e cada coluna representa uma condição. Cores azuis mais intensas indicam redução de atividade celular a partir da condição basal, e cores vermelhas mais intensas indicam aumento da atividade celular a partir da condição basal (conforme legenda). Fonte: o autor (2018).

Como pode ser visto na **Figura 13**, parece haver uma predominância de aumento de atividade celular durante o gato na dPAG, e uma predominância da

redução de atividade celular durante o gato nas i/dlSC. Olhando com mais cautela, é possível notar as similaridades entre as condições do contexto, novidade e confinamento na dPAG, como observado com o gráfico do Efeito de Condição. De modo similar, é possível notar a ligeira diminuição da ativação celular durante o contexto nas i/dlSC, um pouco mais intensa do que no confinamento e na novidade.