UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

CIBELE CARLA GUIMARÃES DE SOUZA

Mapeamento das conexões eferentes e aferentes do núcleo cuneiforme

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

São Paulo
2018

CIBELE CARLA GUIMARÃES DE SOUZA

Mapeamento das conexões eferentes e aferentes do núcleo cuneiforme

Versão Original

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

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Newton Sabino Canteras

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)

Guimarães de Souza, Cibele Carla

Mapeamento das conexões eferentes e aferentes do núcleo cuneiforme / Cibele Carla Guimarães de Souza; orientador Newton Sabino Canteras. -- São Paulo, 2018.

55 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Núcleo Cuneiforme. 2. Comportamento de defesa. 3. Avaliação de risco. 4. Eixo septo-hipocampal. 5. Formação hipocampal. I. Sabino Canteras, Newton , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cibele Carla Guimarães de Souza
Título da Tese: Mapeamento das conexões eferentes e aferentes do núcleo cuneiforme

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

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

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

Examinado(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instuição: .....

Examinado(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instuição: .....

Examinado(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instuição: .....

Examinado(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instuição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instuição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.048/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 085/12/CEUA, datado de 24.08.12 e por solicitação do Prof. Dr. **Newton Sabino Canteras**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Cibele Carla Guimarães de Souza** 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, 13 de maio de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

Ao meu pai, Orlando e a minha mãe, Elizabeth por estarem sempre ao meu lado. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser minha fortaleza e me guiar nos momentos de dificuldade.

Agradeço ao Prof. Dr. Newton Sabino Canteras, por todo o apoio e ensinamento recebido na iniciação científica, mestrado e doutorado. Tenho orgulho de tê-lo como meu orientador.

Agradeço à minha co-orientadora e amiga, Prof. Dra. Sandra Regina Mota Ortiz, uma pessoa que foi fundamental no desenvolvimento deste trabalho. Seu amor pela neuroanatomia e pela docência sempre me incentivaram.

Agradeço aos meus pais, Orlando e Elizabeth e a minha irmã Débora. Meus incentivadores, sempre me apoiando.

Agradeço ao meu amigo Wagner, uma amizade que foi construída durante nossas carreiras científicas.

Agradeço à Geielle e à Raquel, amigas que foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Amanda, técnica do laboratório de Neuroanatomia funcional por toda ajuda.

Agradeço aos funcionários do Departamento de anatomia e ao programa de pós-graduação em ciências morfofuncionais.

Agradeço à agência financiadora CAPES, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Souza CGS. **Mapeamento das conexões eferentes e aferentes do núcleo cuneiforme.** 2018. 55 folhas. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O núcleo cuneiforme é um sítio neural mobilizado após a exposição ao predador, ou ao odor do gato e, a sua estimulação promove respostas defensivas como congelamento motor e fuga. Trabalhos mostram que lesões que acometem o setor dorsal rostral e a parte ventrolateral caudal da substância cinzenta periaquedutal e o núcleo cuneiforme abolem as respostas defensivas e aumentam os comportamentos exploratórios. Com isso, postulamos que o núcleo cuneiforme seria importante na modulação de respostas comportamentais defensivas e, dessa forma, investigamos as suas projeções eferentes e aferentes, para que possamos amplificar o conhecimento acerca do "circuito responsivo a ameaça predatória". Para isso, foram realizadas injeções iontoforéticas unilaterais de leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* no núcleo cuneiforme para o estudo de suas eferências e, injeções iontoforéticas unilaterais de Fluorogold no núcleo cuneiforme para o estudo de suas aferências. Através dos resultados obtidos, observamos que o núcleo cuneiforme apresenta conexões com estruturas importantes para expressão do comportamento de defesa e estaria em posição de receber informações das pistas do predador, uma vez que é aferentado por estruturas que compõem o "circuito responsivo a ameaça predatória" (i.e núcleo hipotalâmico anterior, parte dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico, parte ventrolateral do núcleo pré-mamilar dorsal e coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal). Com os dados das eferências postulamos que o núcleo cuneiforme estaria em posição de retroalimentar o "circuito responsivo a ameaça predatória" e participaria de um circuito neural que modularia a expressão das respostas de avaliação de risco frente ao predador. O colículo superior através de suas projeções eferentes mobilizaria a coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal e o núcleo cuneiforme. O último por sua vez, através das projeções para o núcleo septal medial modularia a geração do ritmo teta no eixo septo-hipocampal. Adicionalmente, o núcleo cuneiforme retroalimentaria a coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal, a porção dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico e o núcleo hipotalâmico anterior, que através de suas eferências

mobilizaria o septo lateral rostral ventrolateral, que potencialmente influenciaria a formação hipocampal.

Palavras-chaves: Núcleo Cuneiforme. Comportamento de defesa. Avaliação de risco. Eixo septo-hipocampal. Formação hipocampal.

ABSTRACT

Souza CGS. The connections of the cuneiform nucleus. 2018. 55 folhas. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The cuneiform nucleus is a neural site mobilized after exposure to the predator, or cat odor, and its stimulation promotes defensive responses such as motor freezing and escape. Studies show that lesions affecting the rostral dorsal sector and the caudal ventrolateral part of the periaqueductal gray matter and the cuneiform nucleus abolish defensive responses and increase exploratory behavior. In this way, we postulate that the cuneiform nucleus would be important in the modulation of defensive behavioral responses and, in this way, we investigate the efferent and afferent projections of the cuneiform nucleus, so that we can amplify the knowledge about the "predatory threat responsive circuit". For this, unilateral iontophoretic injections of leucoagglutinin from *Phaseolus vulgaris* were performed in the cuneiform nucleus for the study of their eferences and, unilateral iontophoretic injections of Fluorogold in the cuneiform nucleus for the study of their afferences. Through the obtained results, we observed that the cuneiform nucleus has connections with structures important for the expression of the defense behavior and would be in a position to receive information from the clues of the predator, since it is inferred by structures that make up the "predatory threat responsive circuit" (ie anterior hypothalamic nucleus, dorsomedial part of the hypothalamic ventromedial nucleus, ventrolateral part of the dorsal pre-mammillary nucleus and dorsolateral column of the periaqueductal gray matter). With the data of the inferences we postulated that the cuneiform nucleus would be in position to feed back the "predatory threat-responsive circuit" and would participate in a neural circuit that would modulate the expression of the risk assessment responses to the predator. The superior colliculus through its efferent projections would mobilize the dorsolateral column of periaqueductal gray matter and the cuneiform nucleus. The latter, in turn, through the projections to the medial septal nucleus would modulate the generation of theta rhythm in the septohippocampal system. Additionally, the cuneiform nucleus would feedback the dorsolateral column of the periaqueductal gray matter, the dorsomedial portion of the hypothalamic ventromedial nucleus and the anterior hypothalamic nucleus, which through its efferences would mobilize the

ventrolateral rostral lateral septum, which would potentially influence the hippocampal formation.

Key-words: Cuneiform nucleus. Defense behavior. Risk assessment. Septohippocampal system. Hippocampal formation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Fotomicrografia de corte frontal de encéfalo de rato ilustrando a organização celular do núcleo cuneiforme a partir da coloração de Nissl e o local de injeção da leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris*.....25

Figura 2- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção das eferências do núcleo cuneiforme para mesencéfalo rostral.....27

Figura 3- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção das eferências do núcleo cuneiforme para mesencéfalo rostral.....28

Figura 4- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção das eferências do núcleo cuneiforme para mesodiencéfalo.....29

Figura 5- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção das eferências do núcleo cuneiforme para diencéfalo.....31

Figura 6- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção das eferências do núcleo cuneiforme para área pré-óptica medial e área septal.....32

Figura 7- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção das eferências do núcleo cuneiforme para parte caudal do núcleo reticular pontinho e núcleo reticular magnocelular.....33

Figura 8- Fotomicrografia de corte frontal de encéfalo de rato do local de injeção de Fluorogold.....35

Figura 9- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção das aferências do núcleo cuneiforme para telencéfalo.....37

Figura 10- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção das aferências do núcleo cuneiforme tálamo.....38

Figura 11- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção das aferências do núcleo cuneiforme hipotálamo.....39

Figura 12- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção das aferências do núcleo cuneiforme para diencéfalo e mesodiencéfalo.....41

Figura 13- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção das aferências do núcleo cuneiforme para substância cinzenta periaquedutal.....42

Figura 14- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção das aferências do núcleo cuneiforme mesencéfalo.....43

Figura 15- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção das aferências do núcleo cuneiforme para a parte caudal do núcleo reticular pontino.....44

Figura 16- Possível circuito neural envolvido na organização das respostas de avaliação de risco frente ao predador.....51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

2 OBJETIVOS 18

3 MATERIAIS E MÉTODOS 19

3.1 Injeções iontoforéticas de leucoaglutinina do Phaseolus vulgaris e de Fluorogold 19

3.2 Perfusão e Histologia 20

3.3 Reação imunoistoquímica para detecção de neurônios anterogradamente marcados por *Phaseolus vulgaris* retrogradamente marcados por Fluorogold 20

3.4 Análise do local de injeção e das projeções eferentes e aferentes do núcleo cuneiforme 21

4 RESULTADOS 22

5 DISCUSSÃO 43

6 CONCLUSÃO 50

REFERÊNCIAS 51

1 INTRODUÇÃO

O medo pode ser definido como um estado de sentimento subjetivo, com alterações comportamentais e fisiológicas que ocorrem em resposta a situações de ameaça ambiental; é um sentimento universal e muito antigo, sendo por esse motivo objeto de interesse em inúmeras pesquisas científicas. O comportamento de defesa consiste em um conjunto de respostas comportamentais altamente conservadas por todos os animais ao longo da evolução, podendo ocorrer em resposta ao ataque de um predador ou um coespecífico ou também, em resposta a um perigo eminente do próprio ambiente, além de serem rapidamente condicionadas ao estímulo ameaçador ou a situações associadas a ele. A resposta de defesa natural (incondicionada) de um animal frente ao seu predador é expressa de forma semelhante em todas as espécies de mamíferos e o fato de ser incondicionada implica que a mesma pode ser eliciada em animais selvagens ou de laboratório sem experiência prévia (BLANCHARD et al., 2001).

Diversos estudos descreveram em detalhes os padrões defensivos dos ratos selvagens e de laboratório em resposta ao predador natural, no caso o gato e a pista olfativa do mesmo (odor de gato), fornecendo uma análise detalhada dos comportamentos de defesa inata e das situações em que eles ocorrem (BLANCHARD; BLANCHARD, 1972; BLANCHARD et al., 1981; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al., 1989; 1990; 1991). A resposta de defesa incondicionada dos roedores consiste das reações de fuga, congelamento motor e avaliação de risco (BLANCHARD et al., 2001); sendo que o congelamento motor constitui a resposta comportamental mais proeminente, frente a ameaça real do predador, enquanto as posturas de avaliação de risco inclui comportamentos de orientação e busca de informações sobre estímulos potencialmente perigosos, seguidos por aproximações da área ou do estímulo ameaçador, como o que ocorre frente ao odor do predador (CANTERAS et al., 2008).

Em roedores, diversas estruturas exercem um papel importante na organização das respostas defensivas. Sabe-se que pistas olfatórias são processadas no bulbo olfatório acessório (MCGREGOR et al., 2004) e posteriormente integradas na parte posteroventral do núcleo medial da amígdala, enquanto os estímulos sensoriais visuais e auditivos são processados pelo núcleo lateral da amígdala, pela parte

posterior do núcleo basomedial da amigdala (MARTINEZ et al., 2011). Ambas as pistas sensoriais processadas na amígdala são projetadas para o circuito hipotalâmico de defesa (CANTERAS, 2002), especificamente para o núcleo ventromedial do hipotálamo que, através de suas eferências (CANTERAS et al., 1994) mobiliza outros dois núcleos, o núcleo hipotalâmico anterior e a parte ventrolateral do núcleo pré-mamilar dorsal. Este, por sua vez, amplifica a detecção das pistas predatórias e influencia as respostas defensivas (CEZARIO et al., 2008) através de suas projeções descendentes para a coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal (CANTERAS et al., 1992). Juntos, esses sítios neurais formam o “circuito responsivo a ameaça predatória” (GROSS; CANTERAS, 2012; CANTERAS; GRAEFF, 2014).

Em particular, a coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal apresenta o maior grau de mobilização durante a exposição direta ao predador (CANTERAS; GOTO, 1999a; COMOLI et al., 2003), bem como os menores limiares para provocar respostas integradas de defesa (BITTENCOURT et al., 2004). Adicionalmente, dados obtidos utilizando como traçador anterógrado a leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* mostraram que seu principal alvo de projeção eferente é o núcleo cuneiforme (MOTA-ORTIZ; CANTERAS, observação pessoal).

De acordo com literatura, o núcleo cuneiforme pode ser mobilizado em animais expostos ao predador natural, ou expostos ao odor do gato (CANTERAS E GOTO, 1999; DIELENBERG et al., 2001), ou após a estimulação do hipotálamo medial (SANDER et al., 1993) e, além disso, microinjeções de glutamato no núcleo cuneiforme produzem respostas defensivas, como congelamento motor e fuga (MITCHELL et al., 1988). Além disso, Netzer e colaboradores (2001) mostraram que a estimulação do núcleo cuneiforme promove a ativação da coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal e induz respostas de excitação, aumento na pressão arterial e na frequência cardíaca. Sendo assim, inferiram que o núcleo cuneiforme e a coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal seriam componentes cruciais na circuitaria neural que modularia as alterações cardiovasculares em resposta as reações defensivas (NETZER et al., 2001).

Adicionalmente, um trabalho realizado em nosso laboratório mostrou que a lesão isolada da parte dorsal rostral da substância cinzenta periaquedutal ou a lesão da parte ventrolateral caudal da substância cinzenta periaquedutal, que acomete o núcleo cuneiforme, inibiu a expressão do congelamento motor e aumentou as respostas de avaliação de risco em animais expostos ao predador. Em contrapartida,

quando a lesão acomete as três regiões (parte dorsal rostral e da parte ventrolateral caudal da substância cinzenta periaquedutal e núcleo cuneiforme) observa-se uma diminuição significativa nas respostas de congelamento motor e de avaliação de risco, aumentando os comportamentos exploratórios em ratos expostos ao gato (Rufino et al., dados não publicados). Com isso, postulamos que tanto a substância cinzenta periaquedutal quanto o núcleo cuneiforme são importantes para a expressão do congelamento motor e para expressão das respostas de avaliação de risco frente a ameaça predatória.

Estudos prévios demonstraram as conexões do núcleo cuneiforme, porém os dados são divergentes. De acordo com Bernard e colaboradores (1989), o núcleo cuneiforme apresenta escassas projeções eferentes para diencéfalo e inferiram que suas projeções seriam quase que exclusivamente para tronco encefálico e medula. Entretanto, trabalhos mostram que o núcleo cuneiforme apresenta eferências para hipotálamo, tálamo e tronco encefálico (EDWARDS, 1975; EDWARDS; OLMOS 1976; KORTE et al., 1992; NETZER et al., 2001).

Com base na literatura e de estudos do nosso grupo, postulamos que o núcleo cuneiforme, um sítio neural mobilizado frente a estímulos ameaçadores ou aversivos e principal alvo de projeção eferente da coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal, seria importante na modulação de respostas comportamentais defensivas. Uma vez que os dados da literatura são discordantes em relação as conexões do núcleo cuneiforme, analisamos as suas projeções eferentes e aferentes para que assim, possamos ampliar o entendimento do “circuito responsivo a ameaça predatória”.

2 OBJETIVOS

Sabendo que o núcleo cuneiforme é o principal alvo de projeção da coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal e que modularia as alterações comportamentais frente a um perigo eminente, este estudo teve como objetivo investigar as conexões eferentes e aferentes do núcleo cuneiforme, para que dessa forma possamos ampliar o conhecimento acerca do “circuito responsivo a ameaça predatória”. Para isso, foram realizadas injeções iontoforéticas unilaterais de leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* no núcleo cuneiforme para o estudo de suas eferências e, injeções iontoforéticas unilaterais de Fluorogold no núcleo cuneiforme para o estudo de suas aferências.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização deste estudo foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*), machos, adultos, com aproximadamente 90 dias de idade. Esses animais foram provenientes do Biotério de Produção de Ratos (ICB, Rede USP de Biotérios) e mantidos no Biotério do departamento de anatomia da USP. Todos os protocolos foram utilizados de acordo com certificado aprovado pela CEUA ICB (decl. 085/ 12/ CEUA) e normas estabelecidas pelo CONCEA. Os ratos foram alojados em gaiolas de polipropileno (30 x 40 x 18 cm), em salas com sistema de ventilação (23 ± 2˚C) e ciclo de luz de 12 h (1:00 - 13:00). Água e comida foram oferecidas *ad libitum* durante todos os procedimentos experimentais.

No estudo das conexões eferentes os animais receberam uma injeção iontoforética de *Phaseolus vulgaris,* um traçador anterógrado no núcleo cuneiforme (n=65). E, para o estudo das conexões aferentes os ratos receberam uma injeção iontoforética de Fluorogold, um traçador retrógrado no núcleo cuneiforme (n=58).

3.1 Injeções iontoforéticas de leucoaglutinina do Phaseolus vulgaris e de Fluorogold

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitonial de Pentobarbital de sódio (Cristália, Itapira, SP, Brasil) na proporção de 0,3 ml/100 g de peso corpóreo e em seguida foram posicionadas no aparelho estereotáxico. No estudo das projeções eferentes os ratos receberam um depósito iontoforético unilateral de leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris a* 2,5% centrado no núcleo cuneiforme, já no estudo das conexões aferentes os animais receberam um depósito iontoforético unilateral de Fluorogold (Fluorochrome, Inc.) a 2,0% (coordenadas: anteroposterior, 8.3mm a partir do bregma; mediolateral, 1.8 a partir da linha média do seio sagital; dorsoventral, 5.35 a partir da superfície do cérebro). As injeções foram realizadas através de micropipetas de vidro com diâmetro interno de ponta da ordem de 20μm, mediante aplicação de +10μA de corrente pulsátil (7seg “on”, 7 seg “off”) durante 15 minutos, provida de uma fonte de corrente constante (Midgard Eletronics, Modelo CS3).

Após o período de injeção, as micropipetas permaneceram no local por 10 minutos para evitar o escoamento do traçador ao longo do trajeto das pipetas, que posteriormente foram retiradas.

3.2 Perfusão e Histologia

Dez dias após o procedimento de cirurgia estereotáxica os animais foram anestesiados por via intraperitoneal de cloridrato de Ketamina 5% (Konig, São Paulo, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina 2% (Konig, São Paulo, SP, Brasil) a 0,2% na proporção 0,4ml/100 g de peso corporal. Em seguida, através de uma bomba peristáltica (Cole 24 Parmer, São Paulo, SP, Brasil), os animais foram perfundidos por via transcardíaca inicialmente com 150 ml de uma solução salina 0,9% seguida de 1000 ml de uma solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M com pH de 7,4. Os encéfalos permaneceram na caixa craniana por 3 horas antes de serem removidos e transferidos para uma solução contendo sacarose 20% em tampão fosfato de potássio 0,02 M, onde permaneceram por aproximadamente 12 horas para crioproteção.

A seguir, cortes frontais, com 40 µm de espessura, foram obtidos utilizando-se um micrótomo de congelação (Carl Zeiss ®, Alemanha). Os cortes foram colhidos sequencialmente e armazenados em cinco séries, onde uma série foi utilizada para detecção imuno-histoqímica de neurônios anterogradamente marcados por *Phaseolus vulgaris* ou para detecção de neurônios retrogradamente marcados por Fluorogold e a série adjacente foi corada pelo método de Nissl, com tionina 0,25%, para ser utilizado como referência citoarquitetônica.

3.3 Reação imuno-histoquímica para detecção de neurônios anterogradamente marcados por *Phaseolus vulgaris* retrogradamente marcados por Fluorogold

Para detecção imuno-histoquímica de neurônios anterogradamente marcados por leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris,* os cortes foram incubados por um período de 72 horas em uma solução de KPBS 0,02M contendo Triton X-100 0,3% e soro normal de cabra a 2%, usando-se um anticorpo primário anti-leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* obtido em coelho (Chemicon International) numa diluição de 1:5000, sob agitação constante, a 4°C. Para localização do complexo antígeno-

anticorpo os foram incubados por 2 horas no anticorpo secundário biotinilado feito em cabra (Biotinylated anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories) na diluição 1:200.

Para detecção imunoistoquímica de neurônios retrogradamente marcados por Fluorogold, os cortes foram inicialmente incubados durante 48 horas em uma solução de KPBS 0,02M contendo Triton X-100 0,3% e soro normal de cabra a 2%, usando-se um anticorpo primário anti-Fluorogold obtido em coelho (Chemicon International) numa diluição de 1:5000. Para localização do complexo antígeno-anticorpo os cortes foram incubados por 1 hora e 30 minutos no anticorpo secundário biotinilado feito em cabra (Biotinylated anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories) na diluição 1:200. Os complexos

Os complexos antígeno-anticorpo foram visualizados usando-se o complexo biotina-avidina-peroxidase numa diluição de 1:200 (ABC Elite Kit, Vector Laboratories). Na sequência, após lavagens sucessivas, os cortes foram incubados em uma solução contendo 50mg de tetrahidrocloreto de 3-3'diaminobenzidina (DAB), 0,6mg de glicose oxidase e 40mg de cloreto de amônio em 100ml de tampão fosfato de sódio 0,1M por 5 minutos. Em seguida foi adicionado β-D-glicose (Sigma Saint Louis, Missouri, USA) e a reação enzimática interrompida após um período variável, em geral em torno de 15 minutos. Após a reação de imunohistoquímica, os cortes foram montados em lâminas recobertas com gelatina e em seguida, os cortes foram desidratados e recobertos com DPX (Aldrich Chemical, Oxford, Mississipi, USA).

3.4 Análise do local de injeção e das projeções eferentes e aferentes do núcleo cuneiforme

As análises das regiões com células marcadas no local de injeção e a distribuição das fibras anterogradamente marcadas e retrogradamente marcadas foram realizadas com auxílio de um microscópio óptico Nikon Eclipse 80i (Nikon Corporation, Chiyoda-ku, Tokyo-to, Japão) equipado com uma câmera digital Nikon DXM1200F (Nikon Corporation). Os cortes foram selecionados e os núcleos de interesse foram delineados com base na série corada pelo método de Nissl, utilizando como referência o atlas Brain maps: structure of the rat brain (SWANSON, 2004).

As figuras foram obtidas utilizando o programa NIS e editadas nos programas Photoshop 7.0 (Adobe Photoshop) e Illustrator 6.0 (Adobe Illustrator), sendo que apenas o brilho, contraste e equilíbrio de cores foram ajustados.

4 RESULTADOS

Inicialmente, analisamos as projeções eferentes do núcleo cuneiforme e, em uma série de experimentos, obtivemos cinco casos com injeções de leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* centradas no núcleo cuneiforme, sendo a distribuição das fibras anterogradamente marcadas muito similar em todos os casos. As Figuras 1A e 1B ilustram a organização celular do núcleo cuneiforme a partir da coloração de Nissl e o local de depósito de *Phaseolus vulgaris* de um caso representativo (PHAL 49).

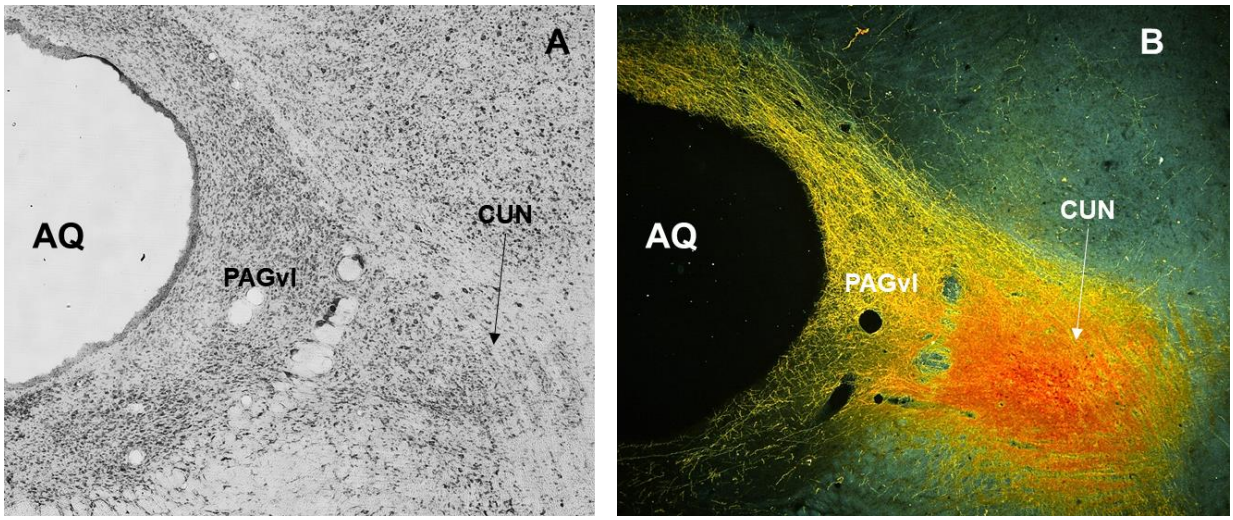

Figura 1- Fotomicrografia de corte frontal de encéfalo de rato ilustrando a organização celular do núcleo cuneiforme a partir da coloração de Nissl (**A** em campo claro) e o local de injeção da leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* (**B** em campo escuro), nível caudal do núcleo dorsal da rafe.. **Abreviaturas:** AQ: aqueduto mesencefálico; PAGvl: coluna ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal; CUN: núcleo cuneiforme.

A partir da análise hodológica das eferências do núcleo cuneiforme podemos observar que este sítio neural apresenta projeções bilaterais para grupos celulares distintos e os axônios anterogradamente marcados seguem duas vias para inervar estruturas rostrais e caudais. A via ascendente, que pode ser dividida em dorsal e ventral, possui axônios que inervam o mesencéfalo rostral, diencéfalo e área septal e, a via descendente apresenta axônios que inervam núcleos pontinos.

Com relação a via dorsal ascendente, muitos neurônios terminam no mesencéfalo rostral (Figuras 2 e 3), onde podemos observar uma grande quantidade de fibras marcadas na substância cinzenta periaquedutal, em particular na coluna ventrolateral (Figura 2D), coluna dorsolateral e coluna dorsomedial, em todos os níveis (Figuras 2A, 2B e 2C). Alguns axônios cursam ventralmente e terminam no núcleo cuneiforme contralateral (Figura 2D) e outros cursam dorsalmente e inervam o colículo superior (Figura 3A). Adicionalmente, observamos uma projeção eferente do núcleo cuneiforme para o núcleo peripeduncular (Figura 3B).

Muitos neurônios ascendem do núcleo cuneiforme até níveis mesodiencefálicos (Figura 4), inervando estruturas dorsais, como o núcleo pré-comissural (Figura 4A) e a parte parvocelular do núcleo subparafascicular do tálamo (Figura 4A) e estruturas ventrais como a área tegmental ventral (Figura 4B). Algumas fibras ascendem de forma dorsal para o diencéfalo caudal e terminam no núcleo posterior do hipotálamo (Figura 4C) e na parte magnocelular do núcleo subparafascicular do tálamo (Figura 4C).

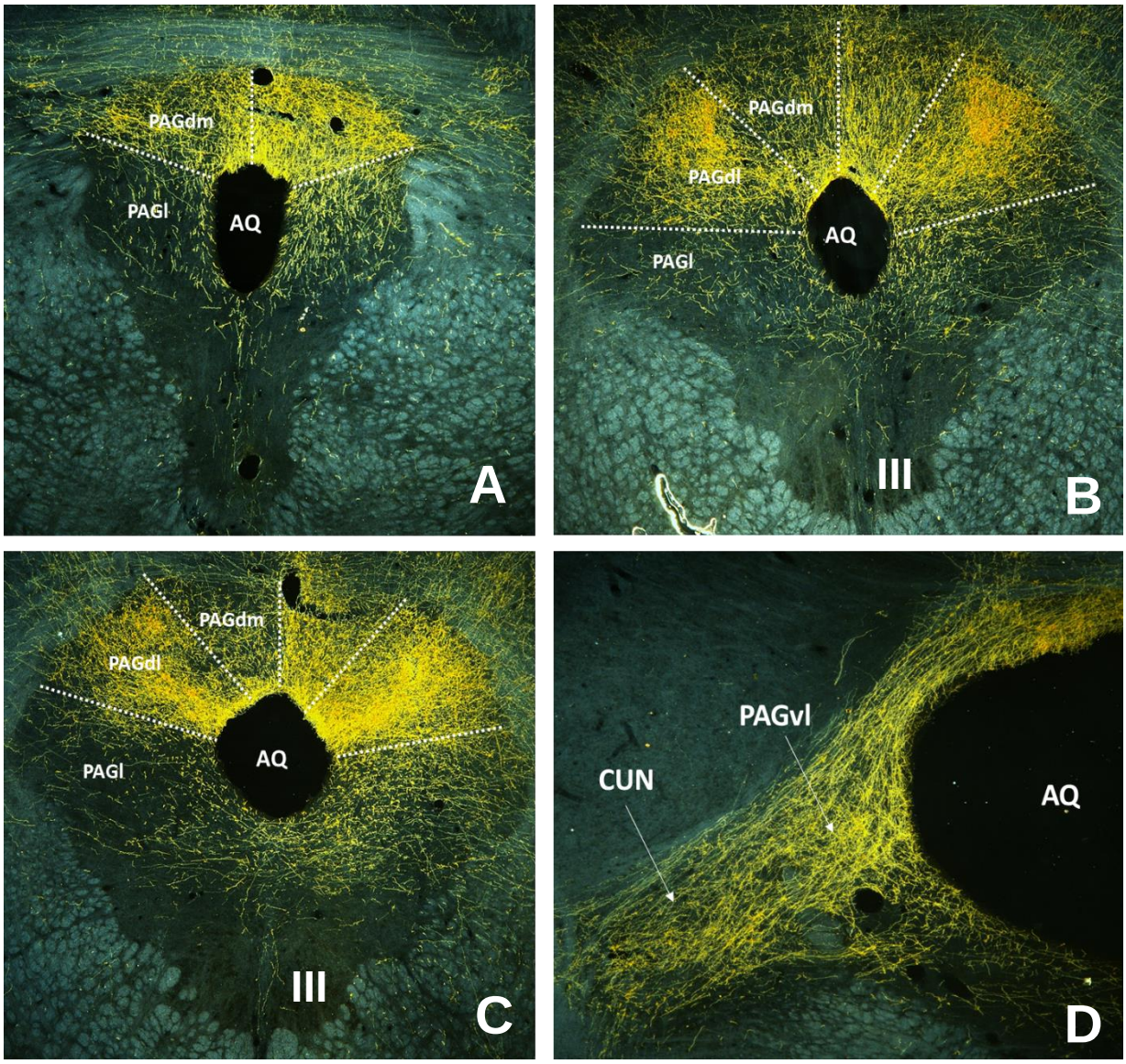

Figura 2- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção de fibras anterogradamente marcadas por leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* no mesencéfalo rostral. **Abreviaturas:** AQ: aqueduto mesencefálico; CUN: núcleo cuneiforme; PAGdm: coluna dorsomedial da substância cinzenta periaquedutal; PAGdl: coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal; PAGl: coluna lateral da substância cinzenta periaquedutal; PAGvl: coluna ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal; III: núcleo oculomotor.

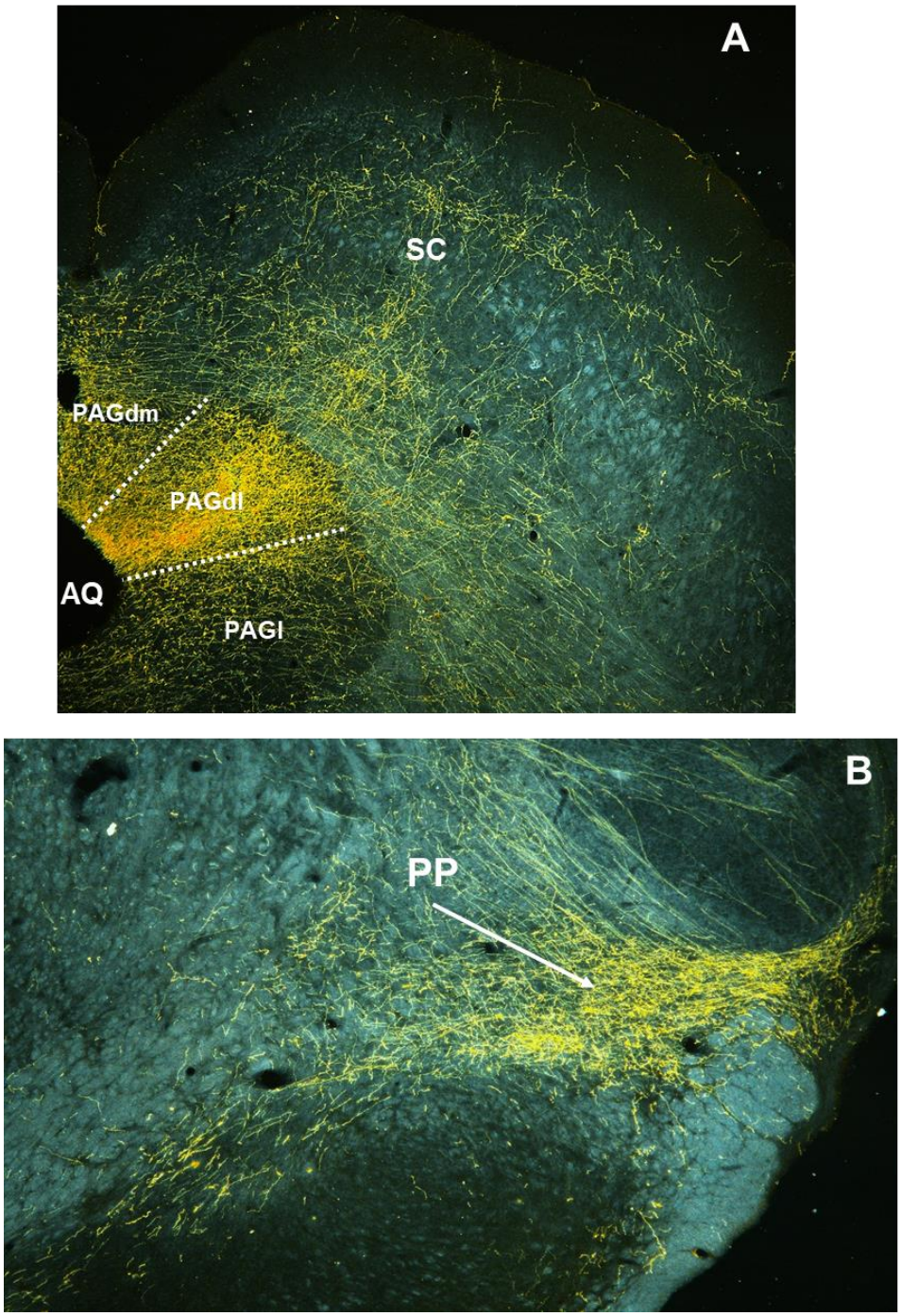

Figura 3- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção de fibras anterogradamente marcadas por leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* no mesencéfalo rostral. **Abreviaturas:** AQ: aqueduto mesencefálico; PAGdm: coluna dorsomedial da substância cinzenta periaquedutal; PAGdl: coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal; PAGl: coluna lateral da substância cinzenta periaquedutal; PP: núcleo peripeduncular; SC: culículo superior.

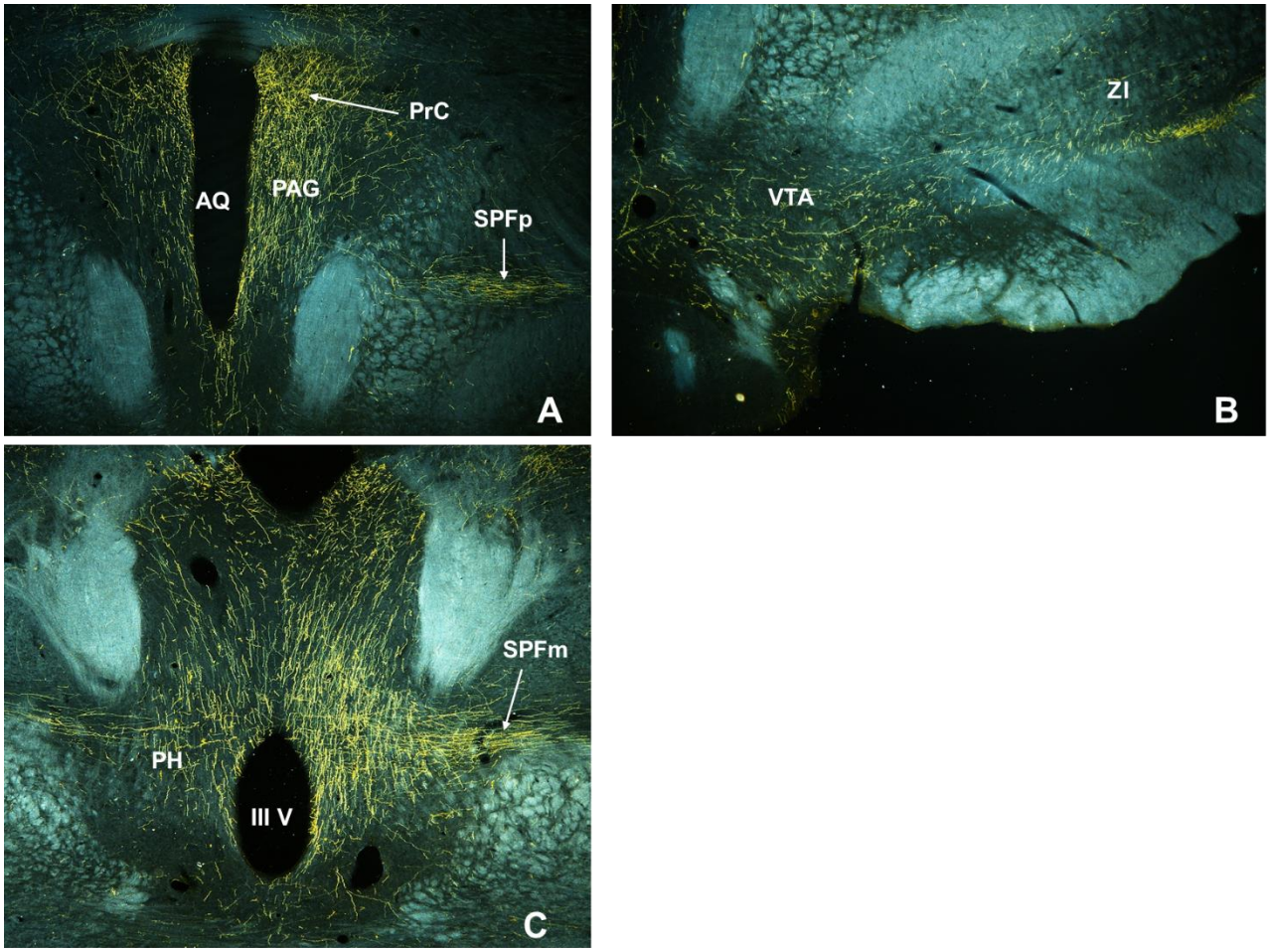

Figura 4- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção de fibras anterogradamente marcadas por leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* no mesodiencéfalo. **Abreviaturas:** AQ: aqueduto mesencefálico; PAG: substância cinzenta periaquedutal; PH: núcleo posterior do hipotálamo; PrC: núcleo pré-comissural; SPFm: parte magnocelular do núcleo subparafascicular do tálamo; SPFp: parte parvocelular do núcleo subparafascicular do tálamo; VTA: área tegmental ventral; III V: terceiro ventrículo; ZI: zona incerta.

A maioria dos axônios da via ascendente dorsal terminam em estruturas localizadas no diencéfalo rostral (Figura 5), onde observamos uma quantidade moderada de axônios no tálamo, inervando a zona incerta (Figura 4B e 5A). No entanto, muitos axônios apresentam terminações ventrais em regiões hipotalâmicas, como no núcleo dorsomedial do hipotálamo (Figura 5A), na porção dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico (Figura 5A e 5B) e no núcleo hipotalâmico anterior, em seus níveis caudal e rostral (Figura 5B e 5C). Adicionalmente, um grupo denso de fibras terminam na região subfornicial da área hipotalâmica lateral (Figura 5B). Alguns neurônios foram observados na área pré-óptica medial caudal e rostral (Figura 6A e 6B), onde poucos ascendem para divisão posterior do núcleo da estria terminal (Figura 6A). Com relação as projeções ascendentes para telencéfalo, na área septal observamos que uma quantidade moderada de fibras inerva o núcleo septal medial e o núcleo da banda diagonal (Figura 6C).

Do local da injeção, fibras descendentes partem do núcleo cuneiforme para núcleos pontinos e terminam na parte caudal do núcleo reticular pontino (Figura 7A) e no núcleo reticular magnocelular (Figura 7B).

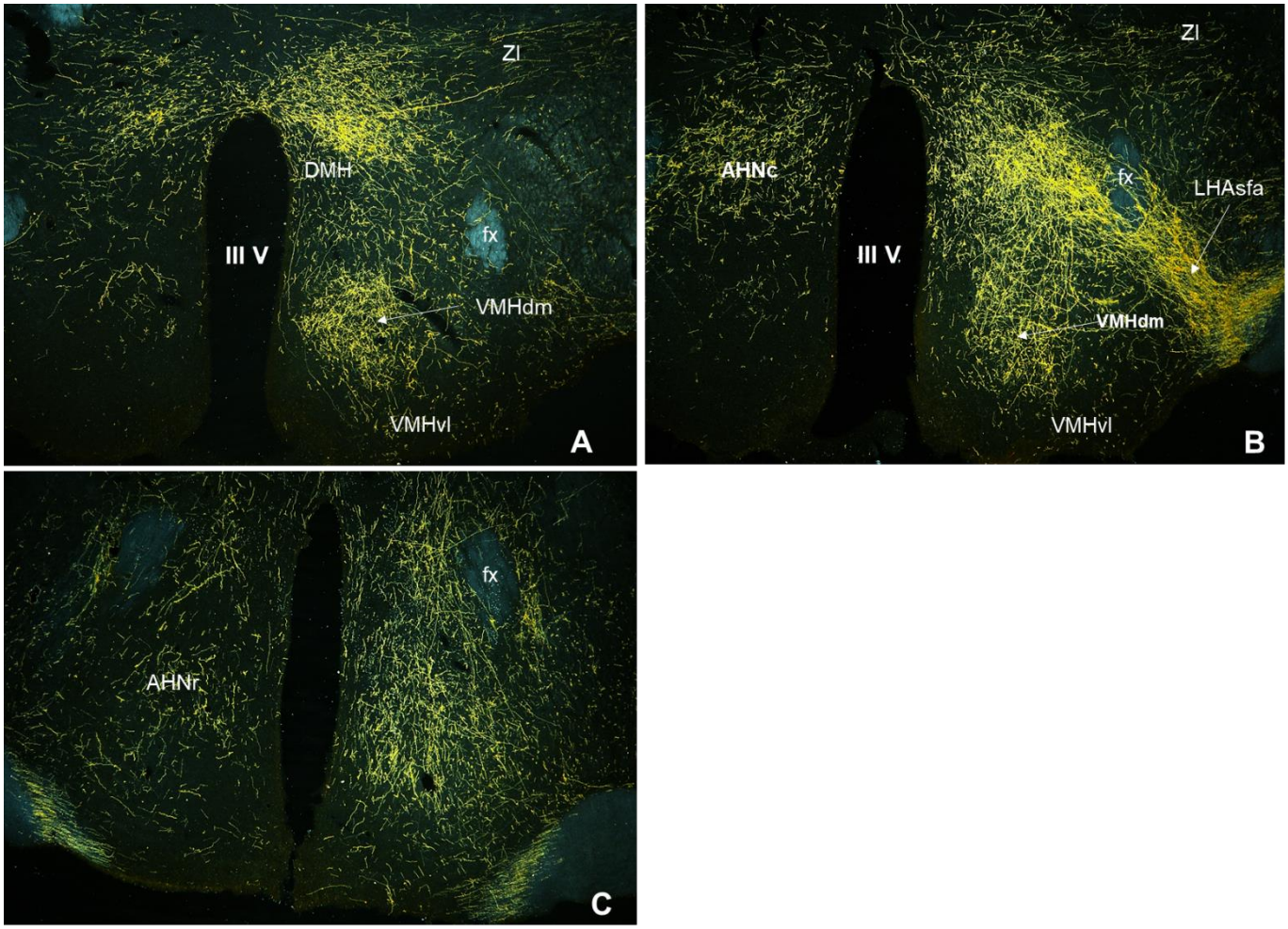

Figura 5- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção de fibras anterogradamente marcadas por leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* no diencéfalo. **Abreviaturas:** AHNc: núcleo hipotalâmico anterior caudal; AHNr: núcleo hipotalâmico anterior rostral; DMH: núcleo dorsomedial do hipotálamo; fx: fórnix; LHAsfa: área hipotalâmica lateral, região subfornicial; VMHdm: parte dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico; VMHvl: parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico; ZI: zona incerta; III V: terceiro ventrículo.

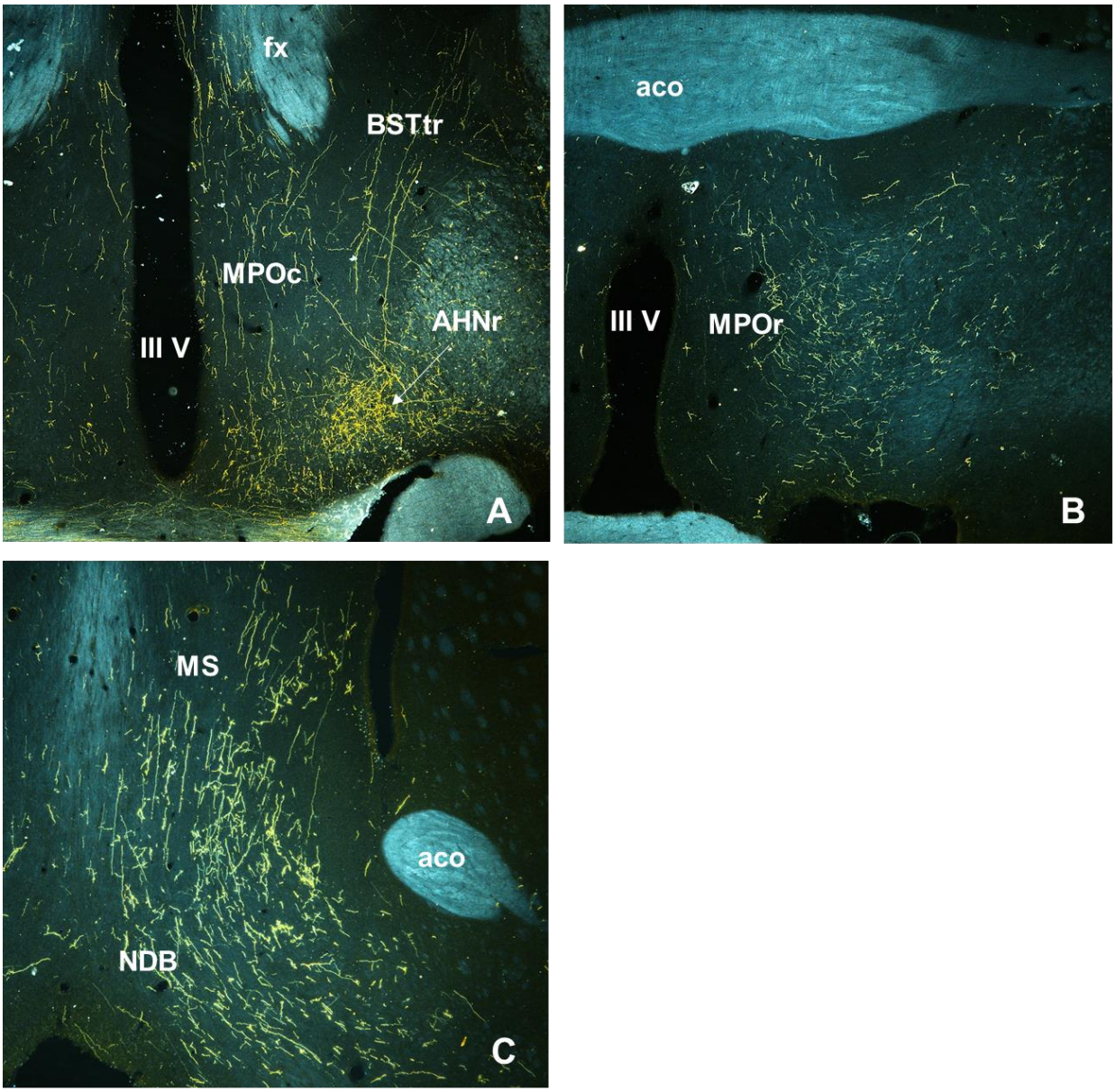

Figura 6- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção de fibras anterogradamente marcadas por leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* na área pré-óptica medial e área septal. **Abreviaturas:** aco: comissura anterior; AHNr: núcleo hipotalâmico anterior rostral; BSTtr: núcleo da estria terminal, divisão posterior; MPOc: área pré-óptica medial caudal; MPOr: área pré-óptica medial rostral; MS: núcleo septal medial; NDB: núcleo da banda diagonal; III V: terceiro ventrículo.

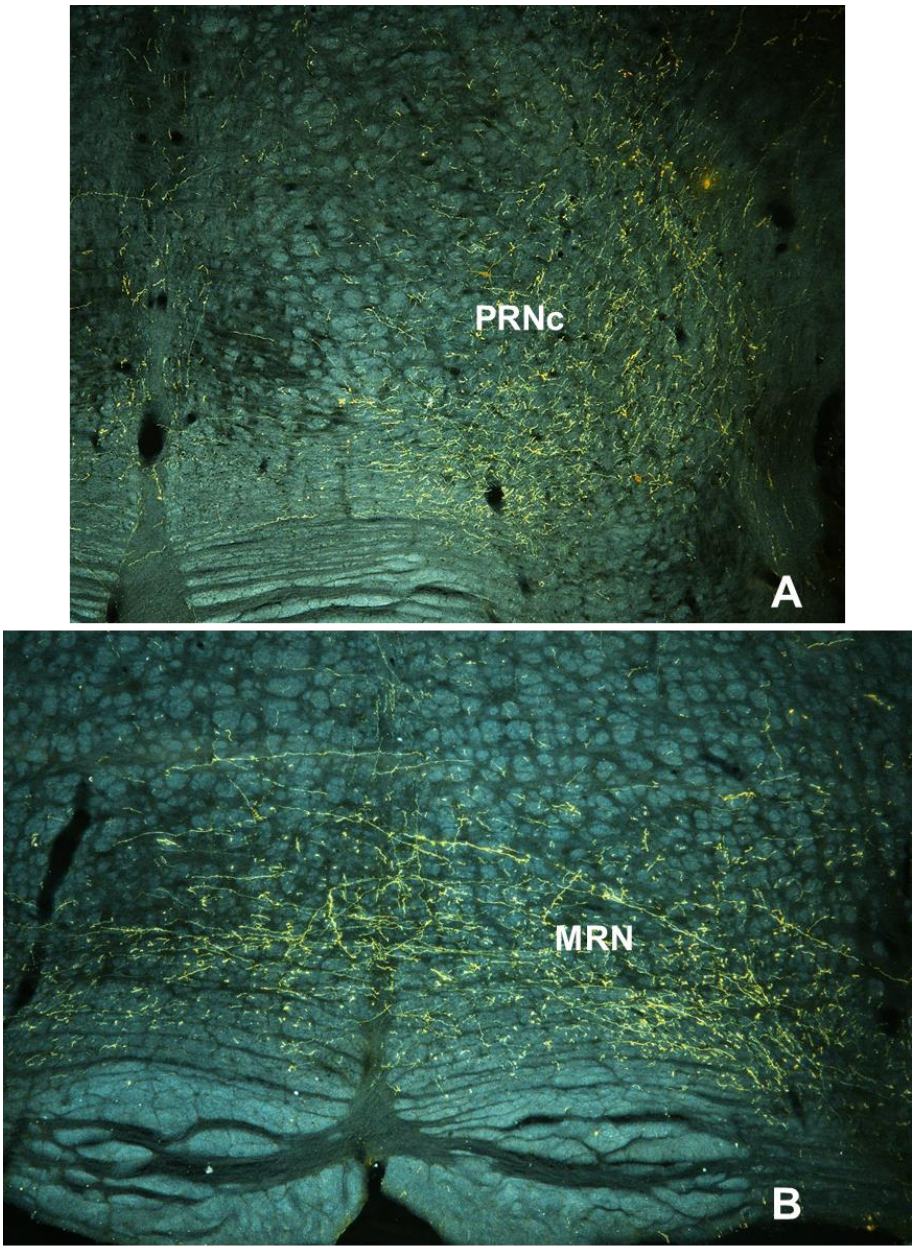

Figura 7- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção de fibras anterogradamente marcadas por leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* na parte caudal do núcleo reticular pontino (**A**) e no núcleo reticular magnocelular (**B**). **Abreviaturas:** MRN: núcleo reticular magnocelular; PRNc: na parte caudal do núcleo reticular pontino.

Em um segundo momento, analisamos as projeções aferentes do núcleo cuneiforme e a distribuição de neurônios retrogradamente marcados foi observada utilizando como traçador retrógrado o Fluorogold. Em cinco experimentos a injeção foi centrada no núcleo cuneiforme, como ilustrado na figura 8 (FG 44), sendo que em todos os casos obtivemos um padrão similar de distribuição das células retrogradamente marcadas.

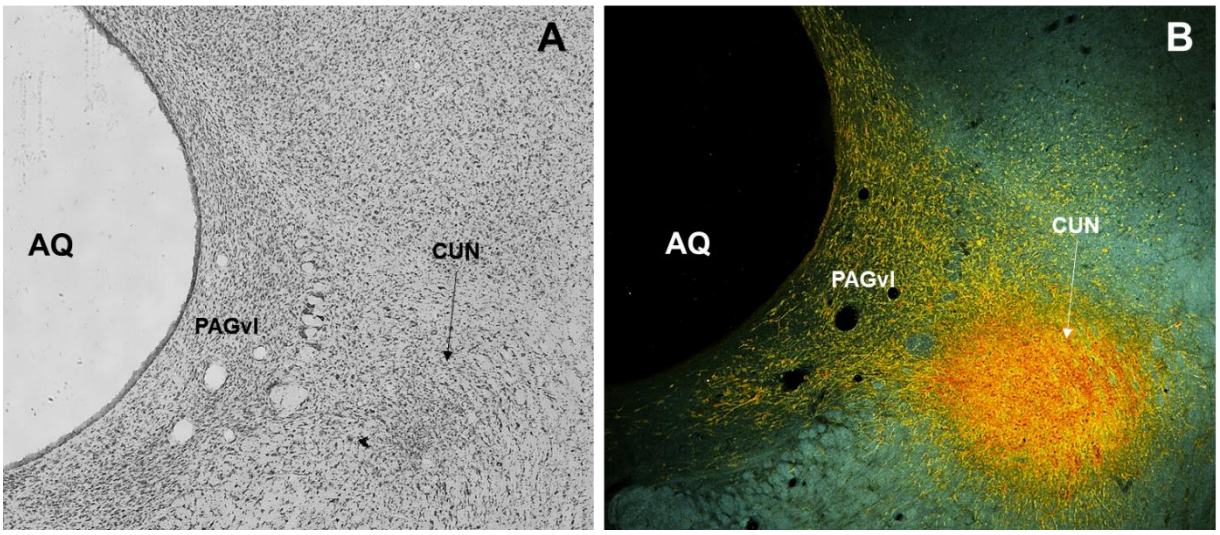

Figura 8- Fotomicrografia de corte frontal de encéfalo de rato ilustrando a organização celular do núcleo cuneiforme a partir da coloração de Nissl (**A** em campo claro) e o local de injeção do Fluorogold (**B** em campo escuro), nível caudal do núcleo dorsal da rafe.. **Abreviaturas:** AQ: aqueduto mesencefálico; PAGvl: coluna ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal; CUN: núcleo cuneiforme.

Uma quantidade esparsa de neurônios retrogradamente marcados foi observada no telencéfalo (Figura 9), em particular na divisão posterior do núcleo da estria terminal (Figura 9A), na substância inominada e no globo pálido (Figura 9B). No tálamo a marcação retrógrada foi mais densa na parte magnocelular (Figura 10A e 12A) e parvocelular (Figura 10B) do núcleo subparafascicular.

Com relação as aferências hipotalâmicas, a área pré-óptica medial (Figura 9A) apresenta um contingente esparso de neurônios. Em contrapartida, uma marcação substancial de corpos celulares foi observada na parte anterior do núcleo hipotalâmico anterior (Figura 11A). Nos níveis hipotalâmicos tuberais, a parte dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico apresentam uma marcação densa de neurônios (Figura 11B) e, no nível mamilar muitos corpos celulares foram observados na parte ventrolateral do núcleo pré-mamilar dorsal (Figura 11C).

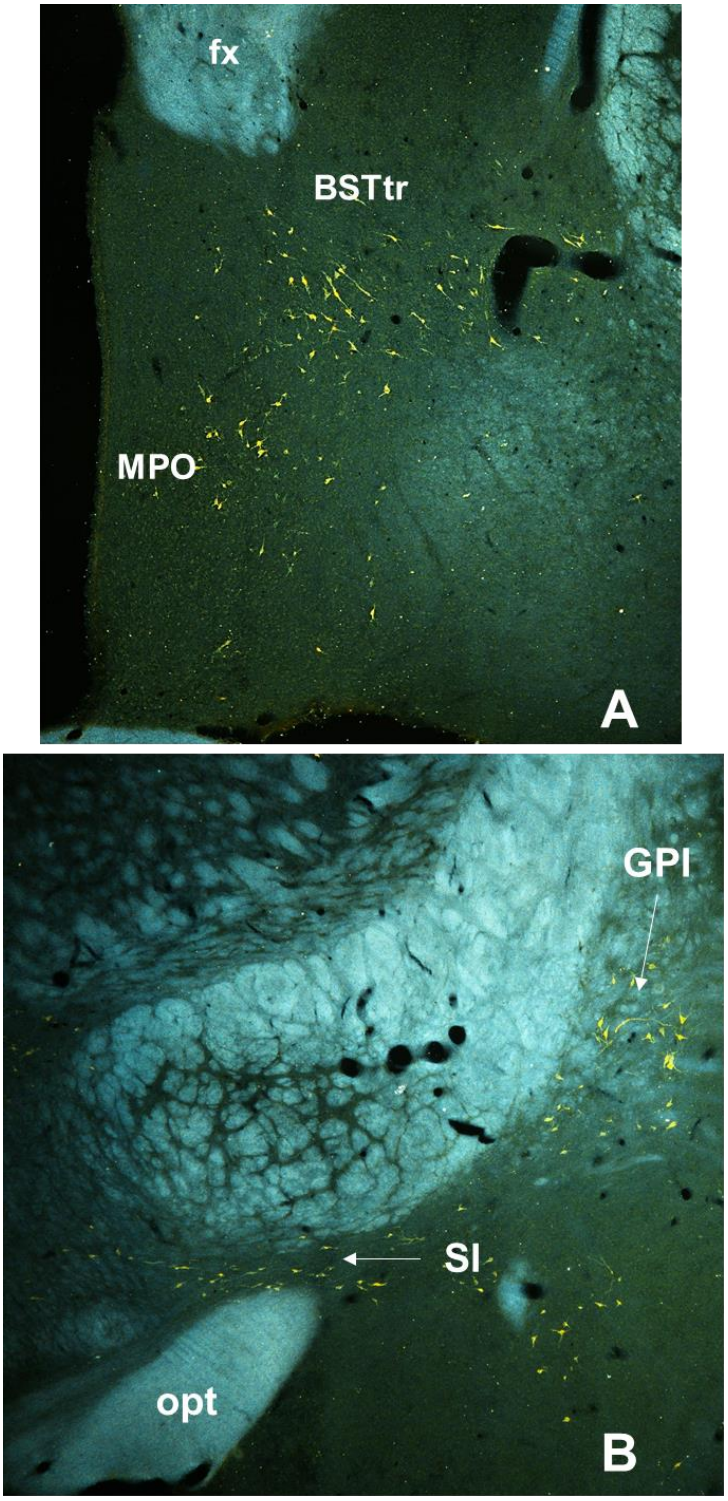

Figura 9- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção de neurônios retrogradamente marcados por Fluorogold no telencéfalo. **Abreviaturas:** BSTtr: parte posterior do núcleo da estria terminal; fx: fórnix; GPI: globo pálido; MPO: área pré-óptica medial; SI: substância inominada; opt; trato óptico.

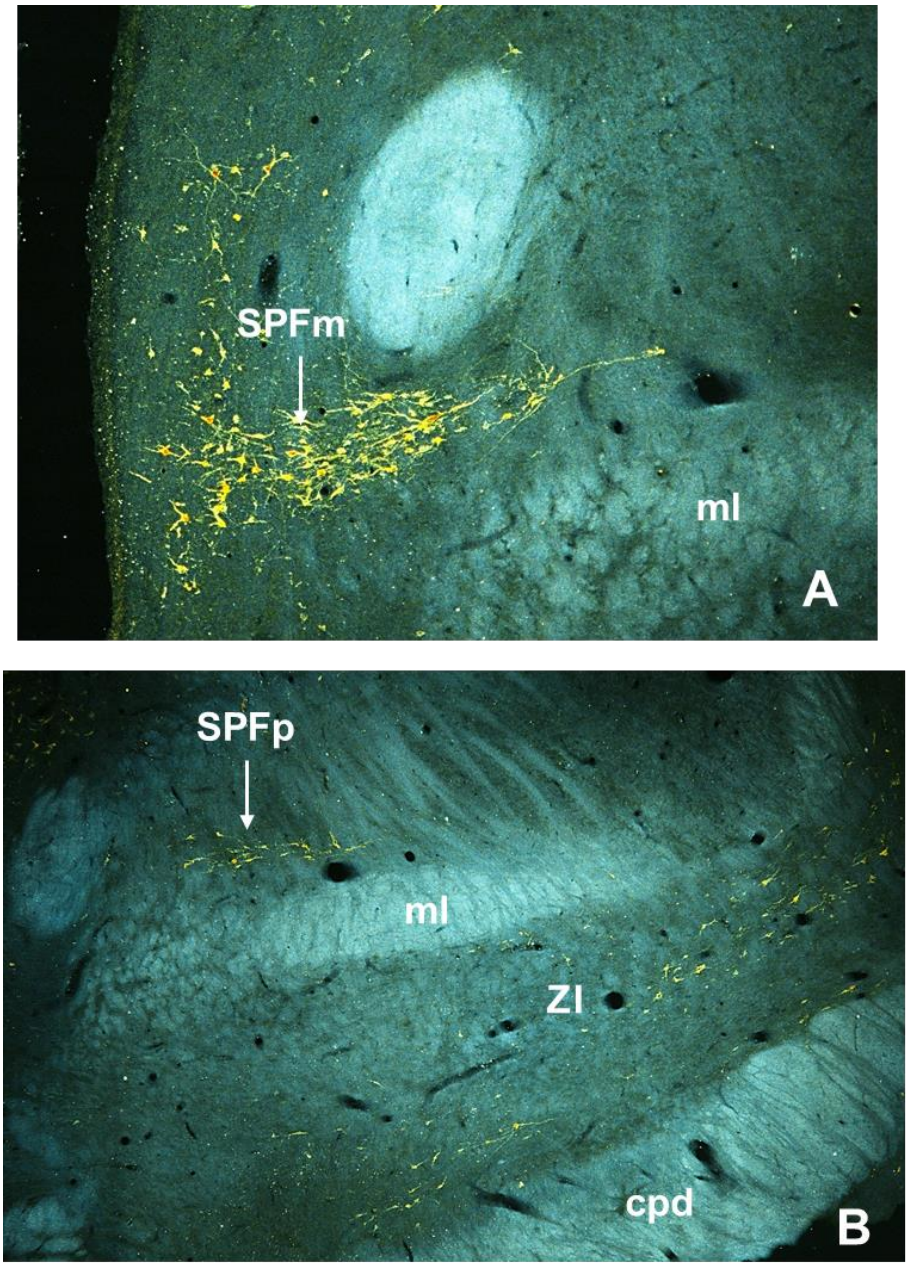

Figura 10- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção de neurônios retrogradamente marcados por Fluorogold no tálamo. **Abreviaturas:** cpd: pedúnculo cerebral; ml: lemnisco medial; SPFm: parte magnocelular do núcleo subparafascicular do tálamo; SPFp: parte parvocelular do núcleo subparafascicular do tálamo; ZI: zona incerta.

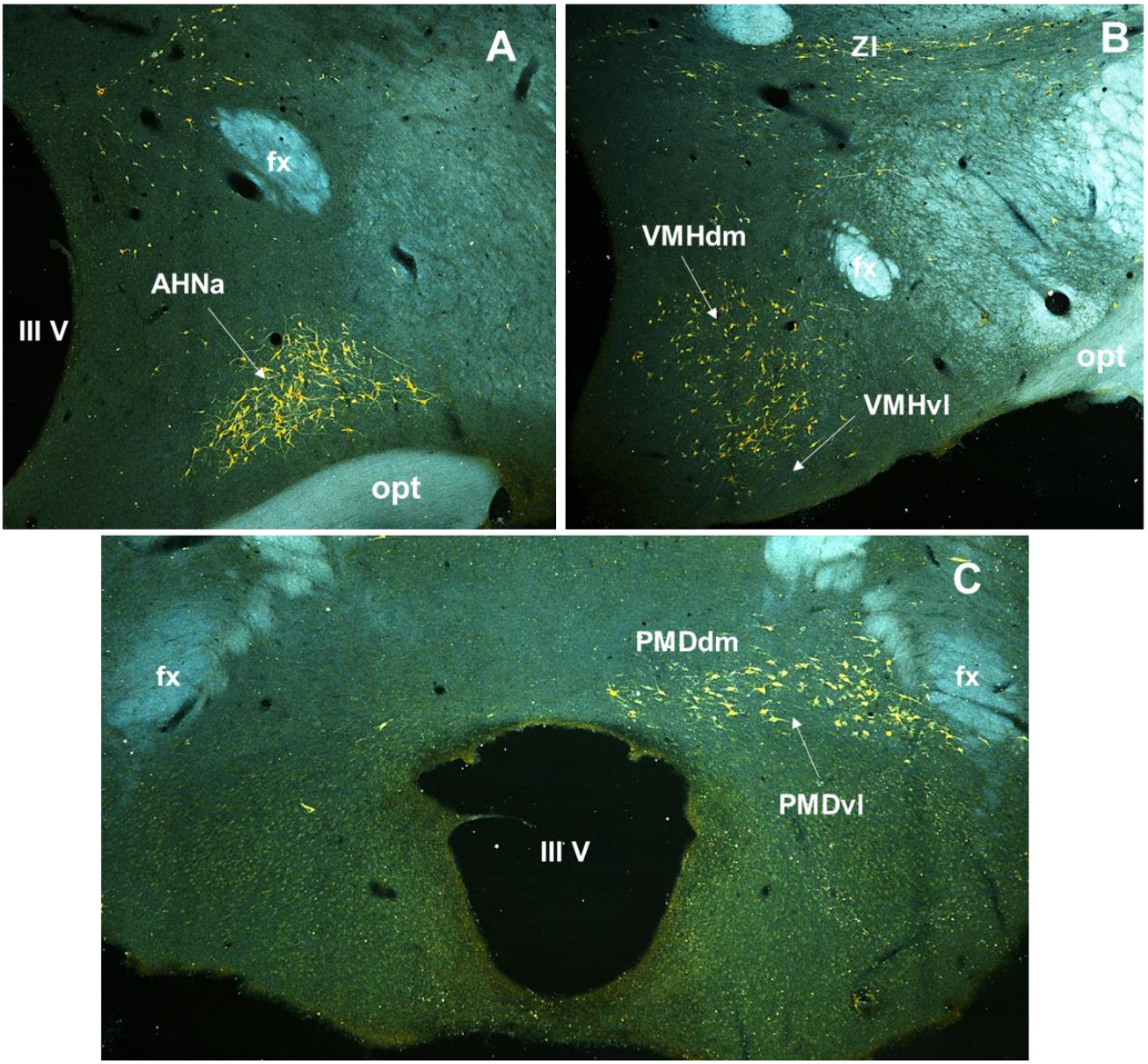

Figura 11- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção de neurônios retrogradamente marcados por Fluorogold no hipotálamo. **Abreviaturas:** AHNa: parte anterior do núcleo hipotalâmico anterior; fx: fórnix; PMDdm: parte dorsomedial do núcleo pré-mamilar dorsal; PMDvl: parte ventrolateral do núcleo pré-mamilar dorsal; VMHdm: parte dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico; VMHvl: parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico; ZI: zona incerta; III V: terceiro ventrículo.

Nos níveis mesodiencefálicos neurônios retrogradamente marcados foram encontrados no núcleo pré-comissural (Figura 12A). No mesencéfalo, uma marcação densa foi encontrada na camada intermediária e profunda do colículo superior (Figura 12B), assim como na coluna dorsolateral (Figura 13A, 13B e 13C) e ventrolateral (Figura 8B) da substância cinzenta periaquedutal. Adicionalmente, as colunas dorsomedial e lateral da substância cinzenta periaquedutal (Figura 13A, 13B e 13C) apresentam uma quantidade esparsa de corpos celulares. Ainda, observamos uma quantidade moderada de neurônios no núcleo peripeduncular (Figura 14A) e na área retrorubral, no núcleo reticular mesencefálico (Figura 14B). Nos níveis pontinos, uma marcação retrograda foi observada na parte caudal do núcleo reticular pontino (Figura 15).

Cabe ressaltar que nos experimentos com injeção iontoforética de Fluorogold no núcleo cuneiforme, a marcação retrógrada foi principalmente ipsilateral. Porém, o núcleo cuneiforme, a coluna dorsomedial, dorsolateral e ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal (Figura 13A, 13B,13C e 13D) apresentam uma marcação retrógrada esparsa contralateral.

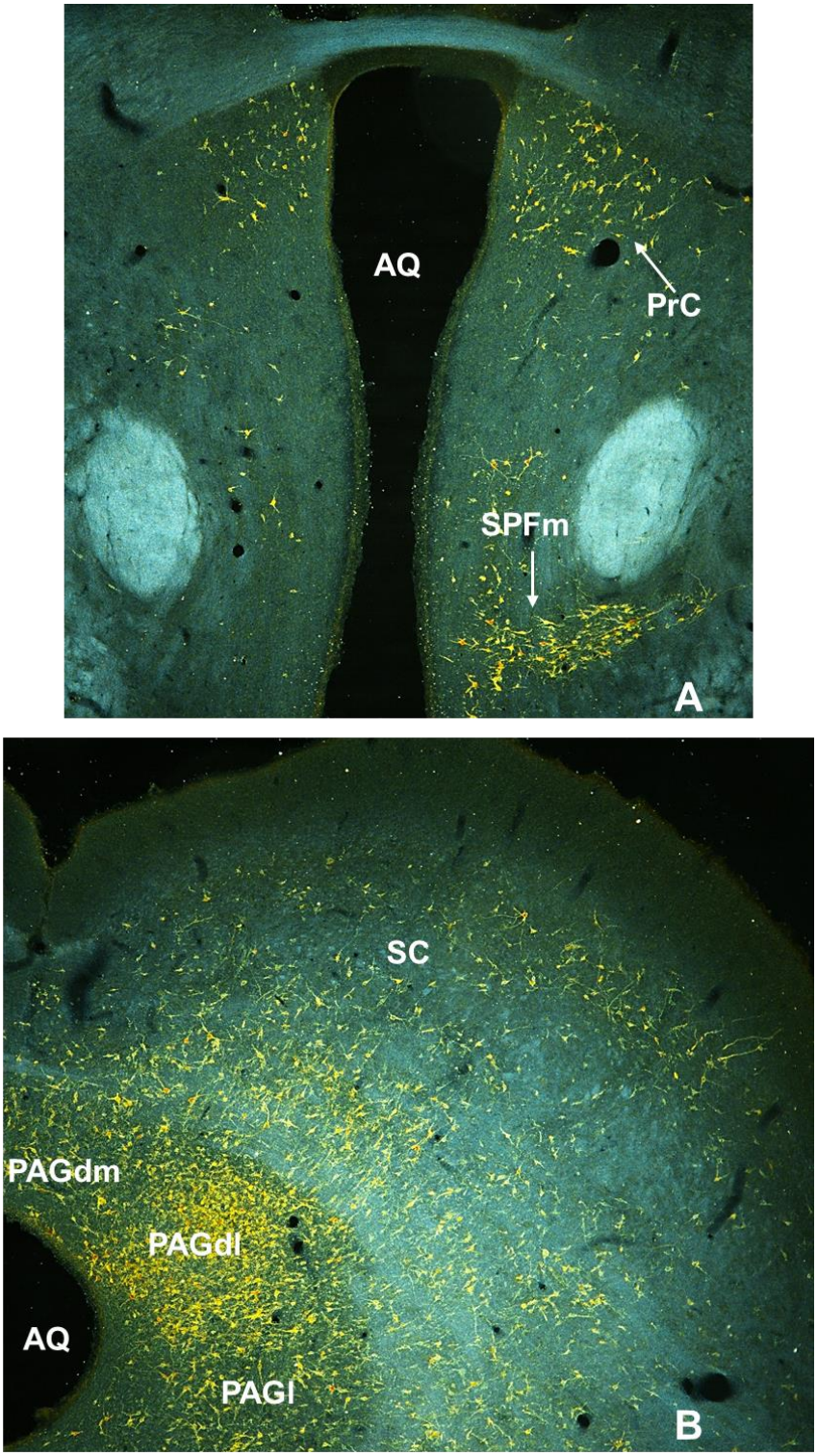

Figura 12- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção de neurônios retrogradamente marcados por Fluorogold no mesodiencéfalo e mesencéfalo. **Abreviaturas:** AQ: aqueduto cerebral; PAGdm: coluna dorsomedial da substância cinzenta periaquedutal; PAGdl: coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal; PAGl: coluna lateral da substância cinzenta periaquedutal; PrC: núcleo pré-comissural; SC: culículo superior; SPFm: parte magnocelular do núcleo subparafascicular do tálamo.

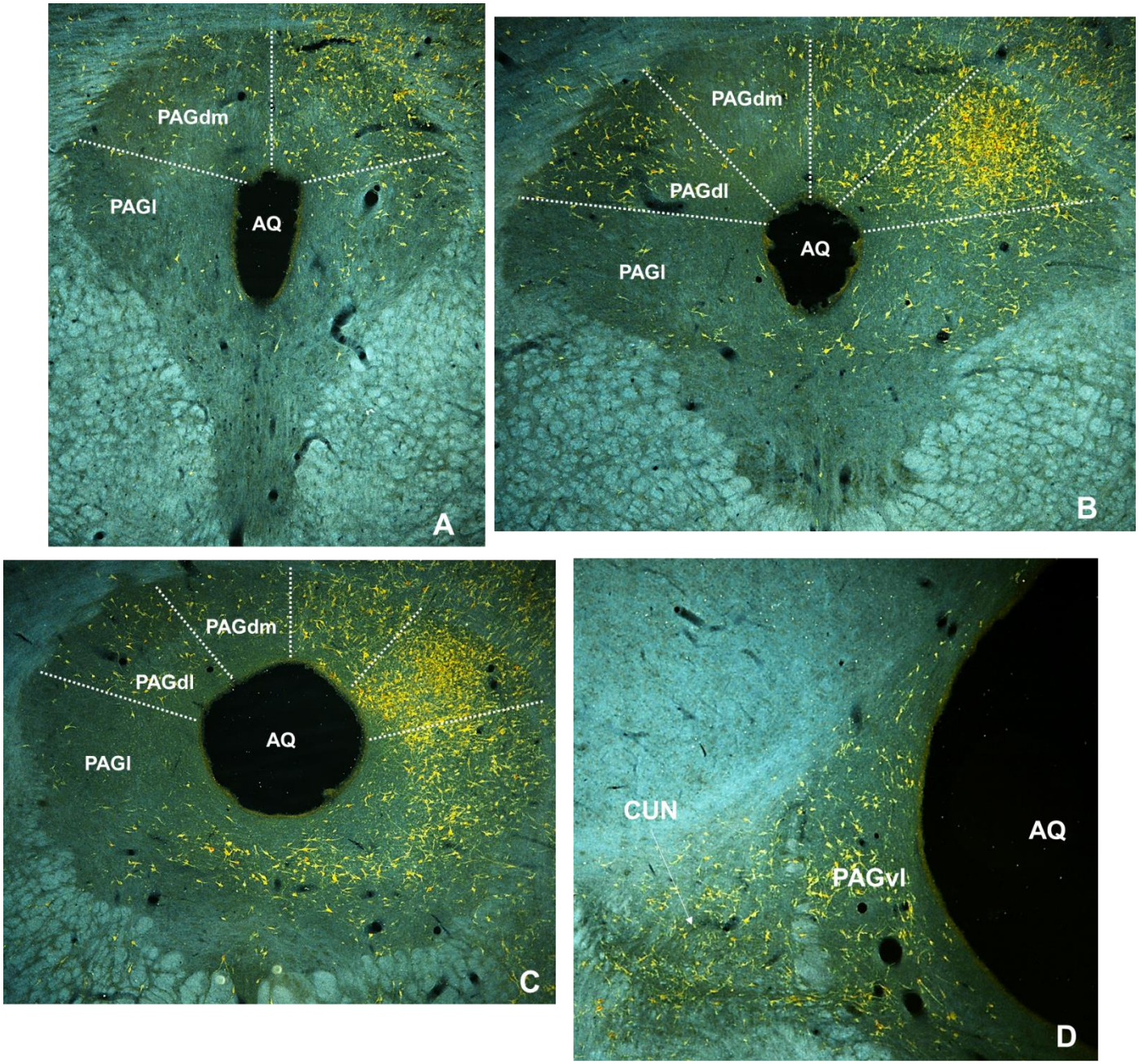

Figura 13- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção de neurônios retrogradamente marcados por Fluorogold na substância cinzenta periaquedutal. **Abreviaturas:** AQ: aqueduto cerebral; CUN: núcleo cuneiforme; PAGdm: coluna dorsomedial da substância cinzenta periaquedutal; PAGdl: coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal; PAGl: coluna lateral da substância cinzenta periaquedutal; PAGvl: coluna ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal.

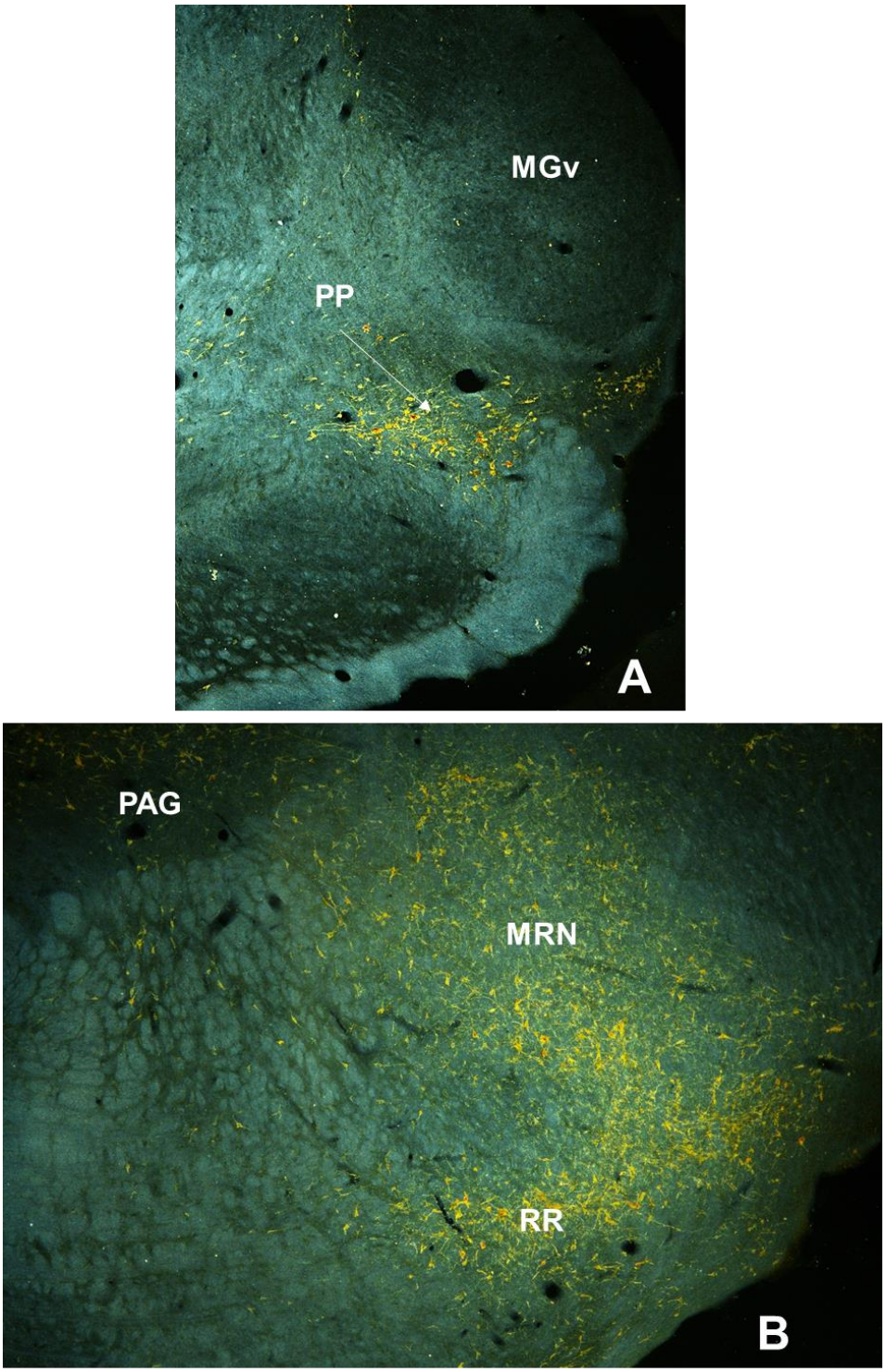

Figura 14- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção de neurônios retrogradamente marcados por Fluorogold no mesencéfalo. **Abreviaturas:** MRN: núcleo reticular mesencefálico; PAG: substância cinzenta periaquedutla; PP: núcleo peripeduncular; RR: núcleo reticular mesencefálico, área retrorubral.

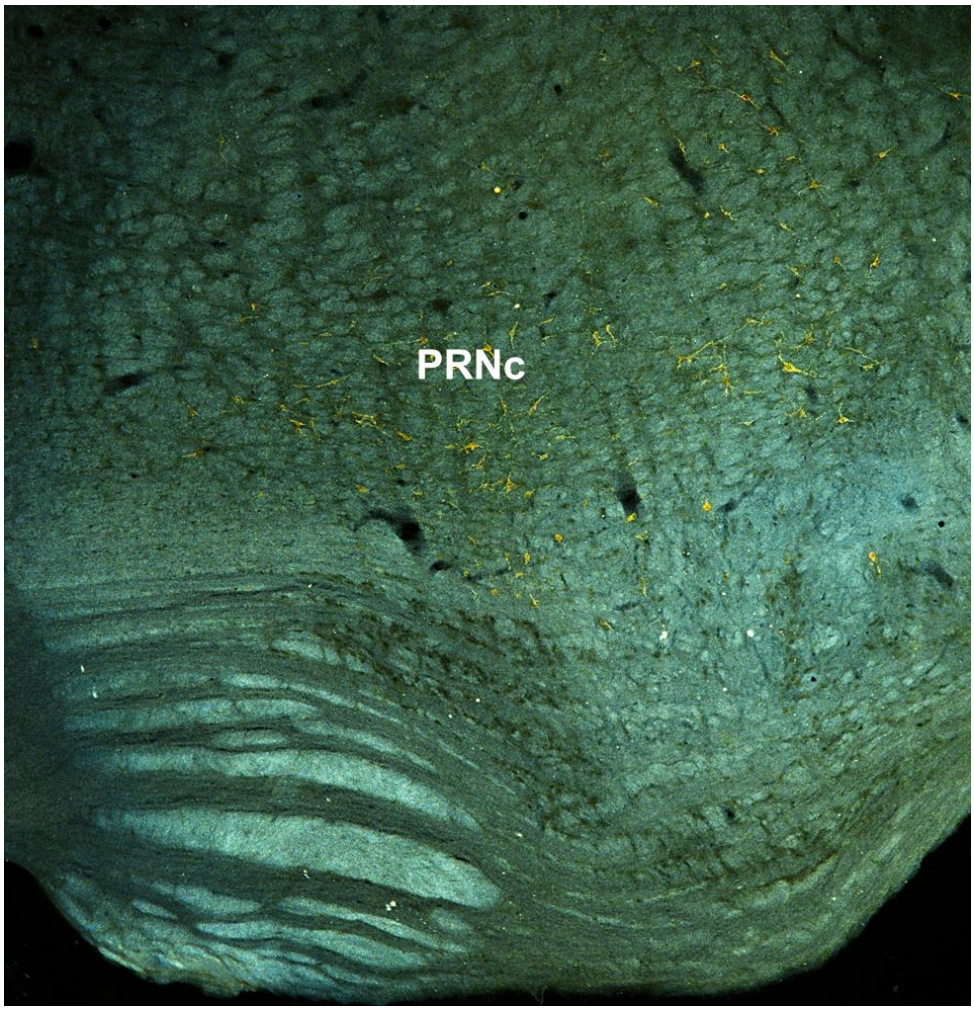

Figura 15- Fotomicrografia em campo escuro de corte frontal de encéfalo de rato reagido imunoistoquimicamente para detecção de neurônios retrogradamente marcados por Fluorogold na parte caudal do núcleo reticular pontino. **Abreviaturas:** PRNc: parte caudal do núcleo reticular pontino.

5 DISCUSSÃO

A exposição ao predador induz em ratos respostas defensivas inatas de fuga, congelamento motor e avaliação de risco (BLANCHARD et al., 2001) e mobiliza estruturas amigdalianas e do circuito hipotalâmico responsivo ao predador, que compreende o núcleo hipotalâmico anterior, a parte dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico e a parte ventrolateral do núcleo pré-mamilar dorsal (CANTERAS, 2002; MARTINEZ et al., 2008). O circuito hipotalâmico ativaria a coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal, região que apresenta o maior grau de mobilização durante a exposição direta ao predador (CANTERAS; GOTO, 1999a; COMOLI et al., 2003). Adicionalmente, a coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal apresenta como principal alvo de projeção eferente o núcleo cuneiforme (MOTA-ORTIZ; CANTERAS, observação pessoal).

Trabalhos mostram que o núcleo cuneiforme é um sítio neural mobilizado após a exposição ao predador, ou ao odor do gato e a sua estimulação promove respostas defensivas, como congelamento motor e fuga (MITCHELL et al., 1988; CANTERAS; GOTO, 1999a; DIELENBERG et al., 2001). Dessa forma, com o objetivo de ampliar o conhecimento acerca da circuitaria neural do comportamento de defesa analisamos as projeções eferente e aferentes do núcleo cuneiforme.

Os resultados deste estudo sugerem que o núcleo cuneiforme apresenta conexões com diversas áreas amplamente distribuídas pelo prosencéfalo e tronco cerebral. Corroborando nossos dados das aferências, estudos prévios mostram que o núcleo anterior do hipotálamo (RISOLD et al., 1994), a parte dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico (CANTERA et al., 1994), o núcleo pré-mamilar dorsal (CANTERAS; SWANSON, 1992), o núcleo pré-comissural (CANTERAS; GOTO, 1999b), a coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal (MOTA-ORTIZ; CANTERAS, observação pessoal; BERNARD et al; 1989), o culículo superior (FURIGO et al., 2010; REDGRAVE et al., 1987; MITCHEII et al., 1988), o núcleo cuneiforme contralateral e a área peripeduncular (ARNAULT; ROGER, 1987; BERNARD et al; 1989) apresentam projeções para o núcleo cuneiforme.

Com relação as eferências do núcleo cuneiforme, dados da literatura são divergentes. De acordo com Korte e colaboradores (1992) as conexões eferentes seriam ipsilaterais, porém no nosso estudo temos que as projeções são em grande parte bilaterais. Bernard e colaboradores (1989) inferiram que o núcleo cuneiforme

apresenta um contingente muito esparso de fibras no diencéfalo e que as projeções seriam quase que exclusivamente para tronco encefálico e medula. Porém, corroborando nossos dados, trabalhos mostram que o núcleo cuneiforme apresenta projeções eferentes para a parte caudal do núcleo reticular pontino, o culiculo superior, a coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal, a área tegmental ventral, o núcleo pré-comissural, o núcleo posterior do hipotálamo, a área hipotalâmica lateral, a zona incerta e o núcleo da estria terminal (BERNARD et al; 1989; KORTE et al., 1992; ZEMLAN; BEHBEHANI, 1988; CANTERAS; GOTO, 1999b; EDWARDS ; OLMOS, 1976).

Com relação as eferências do núcleo cuneiforme, os nossos resultados divergem com os da literatura. Korte e colaboradores (1992) inferiram que as conexões eferentes são ipsilaterais, porém no nosso estudo temos que as projeções são em grande parte bilaterais. De acordo com Bernard e colaboradores (1989), o núcleo cuneiforme apresenta um contingente muito esparso de fibras no diencéfalo e inferiram que as projeções seriam quase que exclusivamente para tronco encefálico e medula. Entretanto, podemos inferir que os principais alvos de projeções eferentes do núcleo cuneiforme, além da substância cinzenta periaquedutal, são para sítios neurais hipotalâmicos.

Com os dados obtidos, postulamos que o núcleo cuneiforme possui conexões com estruturas importantes para expressão do comportamento de defesa e, dessa forma, discutiremos suas implicações funcionais dentro de um possível circuito neural responsável pela modulação das respostas defensivas.

O núcleo cuneiforme apresenta projeções eferentes e aferentes para o núcleo da estria terminal, um sítio neural que exerce um papel regulador nas respostas defensivas, pois seria uma região que conecta estruturas envolvidas com a resposta condicionada associada ao contexto, como amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal (DONG et al., 2001a; DONG et al., 2001b; VERTES, 2006; CHOI et al., 2007; CANTERAS et al., 2010) com o hipotálamo e áreas do tronco encefálico que regulam respostas autonômicas (HERMAN e CULLINAN, 1997; ALHEID, 2003). Estudos com lesão ou inativação farmacológica do núcleo da estria terminal mostraram que este sítio neural seria importante para expressão de respostas aversivas, como o congelamento motor, o aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca em animais que foram expostos ao ambiente que previamente foi associado com o choque nas patas (GRAY et al., 1993; SULLIVAN et al., 2004, RESSTEL et al., 2008).

Com a análise hodológica observamos que o núcleo cuneiforme possui conexões eferentes e aferentes com a zona incerta. Dados da literatura mostram que zona incerta possui principalmente neurônios gabaérgicos que, por sua vez, inervam neurônios excitatórios da coluna dorsolateral e da coluna ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal (CHOU et al., 2018), regiões que sabidamente regulam respostas defensivas como fuga e congelamento motor. A ativação optogenética dos neurônios inibitórios da zona incerta reduziu os comportamentos de fuga, em resposta a um som e de congelamento motor induzido pelo choque nas patas, em contrapartida, a inibição dos neurônios gabaérgicos da zona incerta aumentou a expressão dessas respostas defensivas (CHOU et al., 2018).

Dados da literatura mostram que o núcleo pré-comissural é mobilizado durante a exposição ao predador e, corroborando estudos anteriores (CANTERAS e GOTO, 1999b), nossos resultados mostram que o núcleo cuneiforme apresenta conexões eferentes e aferentes com este sítio neural. De acordo com Canteras e Goto (1999b) o núcleo pré-comissural é um componente da parte rostral da substância cinzenta periaquedutal e integra informações do predador de diversas estruturas envolvidas no comportamento defensivo, como o núcleo septal lateral, o núcleo hipotalâmico anterior, culículo superior e o núcleo cuneiforme. Além disso, o núcleo pré-comissural apresenta conexões com as colunas dorsomedial, dorsolateral e ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal, regiões associadas com a modulação de respostas defensivas.

Através do estudo das aferências do núcleo cuneiforme, podemos inferir que possivelmente este sítio neural está envolvido na modulação da resposta de medo incondicionanda, pois estaria em posição de receber informações das pistas do predador, uma vez que é aferentado por estruturas que compõem o “circuito responsivo a ameaça predatória” (i.e núcleo hipotalâmico anterior, parte dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico, parte ventrolateral do núcleo pré-mamilar dorsal e coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal). Adicionalmente, a parte intermédiária e profunda do colículo superior apresenta uma marcação substancial de neurônios retrogradamente marcados e, de acordo com estudos anteriores (FURIGO et al., 2010; REDGRAVE et al., 1987) é uma estrutura responsiva a estímulos visuais que se projeta densamente para coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal e para o núcleo cuneiforme. Mitchell e colaboradores (1988) inferiram

que a projeção do colículo superior para o núcleo cuneiforme estaria envolvida nas respostas de congelamento motor e fuga.

No estudo das projeções eferentes do núcleo cuneiforme observamos que este sítio neural possui uma densa projeção bilateral para coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal, corroborando os resultados de estudos prévios (NETZER et al., 2011). Além disso, Netzer e colaboradores mostraram que a coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal apresenta uma mobilização após a estimulação do núcleo cuneiforme.

Muitos são os trabalhos que demonstraram o papel da coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal como uma estrutura crítica para a expressão das respostas de defesa frente ao predador (BANDLER E SHIPLEY, 1994; CARRIVE, 1993; FANSELOW, 1991). Adicionalmente, Cezário e colaboradores (2008) inferiram que além de mediar respostas incondicionadas emitidas frente ao gato, a coluna dorsolateral da substância cinzenta periquedutal poderia estar relacionada com a emissão de respostas contextualmente condicionadas a ambientes hostis onde o predador não está presente. Especificamente, a diminuição da ativação da coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal produzida pela inativação farmacológica por muscimol do núcleo pré-mamilar dorsal, induziu a ocorrência de respostas comportamentais puramente exploratórias, em contextos onde o animal havia previamente confrontado o predador.

Diferente de estudos de mapeamento anteriores (ZEMLAN; BEHBEHANI, 1988; BERNARD et al., 1989; KORTE et al., 1992; EDWARDS, 1975; EDWARDS; OLMOS, 1976; NETZER et al., 2011; BAJIC; PROUDFIT et al., 2013), observamos que o núcleo cuneiforme apresenta densas projeções bilaterais para a coluna ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal, que sabidamente é um sítio neural crítico para a expressão de respostas de medo condicionado, incluindo o congelamento motor, a vocalização e a analgesia condicionada, uma vez que lesões deste setor reduzem as respostas de congelamento motor a um estímulo neutro, associado a um estímulo doloroso, no caso o choque nas patas (VIANNA et al., 2001).

Com os dados obtidos temos que o núcleo cuneiforme projeta-se para região subfornicial da área hipotalâmica lateral e para o núcleo hipotalâmico anterior e, ambos, estão envolvidos na integração de informações do sistema septo-hipocampal veiculadas pela parte rostral do núcleo septal lateral (RISOLD; SWANSON, 1997), que por sua vez, é inervado por regiões hipocampais que são particularmente aferentadas

por grupos amigdalianos responsivos à presença do predador, tais como o núcleo lateral e o núcleo basomedial (PETROVICH et al., 2001).

A porção dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico, um outro sítio neural que recebe densas projeções do núcleo cuneiforme, é mobilizado em resposta à presença do gato e integra preferencialmente informações de sítios amigdalianos que respondem à presença do predador (CANTERAS et al., 1999). Através de suas eferências, a porção dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico (CANTERAS et al., 1994) mobilizaria o núcleo hipotalâmico anterior e a parte ventrolateral do núcleo pré-mamilar dorsal. Adicionalmente, a parte dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico envia projeções maciças para a porção rostral da substância cinzenta periaquedutal (CANTERAS et al., 1994).

Correlacionando os achados hodológicos com dados da literatura, podemos inferir que o núcleo cuneiforme estaria em posição de retroalimentar o “circuito responsivo a ameaça predatória” e estaria envolvido em uma circuitaria neural que modularia as respostas de avaliação de risco. Reforçando nossa hipótese, um estudo do nosso grupo mostrou que lesões isoladas do setor dorsal rostral ou da parte ventrolateral caudal da substância cinzenta periaquedutal (parte ventrolateral caudal, que acomete adjacentemente o núcleo cuneiforme) inibem a expressão do congelamento motor e aumentam as respostas de avaliação de risco. Por outro lado, lesões combinadas da parte dorsal rostral e da parte ventrolateral caudal da substância cinzenta periaquedutal e do núcleo cuneiforme aboliram as respostas defensivas e diminuíram a ativação da parte posterior do núcleo hipotalâmico anterior e do septo lateral rostral ventrolateral (RUFINO et al., dados não publicados).

A partir da análise dos nossos resultados observamos que o núcleo cuneiforme apresenta uma projeção eferente para o núcleo septal medial, um sítio neural que apresenta uma densa projeção para formação hipocampal (AMARAL; KURZ, 1985; WAINER et al., 1985), assim como o septo lateral (RISOLD; SWANSON, 1997). Cabe ressaltar que para o início do comportamento exploratório a geração e propagação do ritmo teta ao longo do circuito septo-hipocampal é de fundamental importância (TSANOV, 2017). Adicionalmente, evidências mostram que a aplicação de um antagonista de receptor GABA-A no septo lateral aumenta a expressão das respostas de avaliação de risco, além de gerar um aumento do ritmo teta hipocampal (FARIAS et al., observação pessoal). Em contrapartida, a administração de muscimol, um agonista gabaérgico, no núcleo septal medial atenua as respostas de farejamento e a

frequência do ritmo teta (TSANOV et al., 2014). Dessa forma, é licito pensarmos que as respostas de avaliação de risco estejam sendo moduladas através de um circuito neural que envolve o núcleo cuneiforme e o eixo septo-hipocampal.

O hipocampo apresenta um papel importante na modulação de estados afetivos/emocionais, tais como a ansiedade (GRAY; MCNAUGHTON, 1996). Esta estrutura parece ter um papel central na detecção de conflitos, gerando respostas que variam entre aproximação e esquiva do estímulo aversivo. A ocorrência destas respostas levaria ao quadro de ansiedade. Esta situação de conflito onde possivelmente ocasionaria a ansiedade, se adéqua perfeitamente a situações onde o animal realiza respostas de avaliação de risco. Um estudo de Pentkowski e colaboradores (2006) mostra que lesões do hipocampo ventral interferem nas respostas de avaliação de risco de animais expostos ao ambiente previamente associado ao predador.

Dessa forma, com os resultados obtidos, postulamos um possível circuito neural envolvido na organização das respostas de avaliação de risco frente ao gato. Estímulos visuais do predador seriam integrados no colículo superior, que através de suas projeções eferentes mobilizaria a coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal e o núcleo cuneiforme. O último por sua vez, através das projeções para o núcleo septal medial possivelmente modularia a geração do ritmo teta no eixo septo-hipocampal. Adicionalmente, o núcleo cuneiforme retroalimentaria a coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal, a porção dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico e o núcleo hipotalâmico anterior, que através de suas eferências mobilizaria o septo lateral rostral ventrolateral, que potencialmente influenciaria a formação hipocampal (Figura 16).

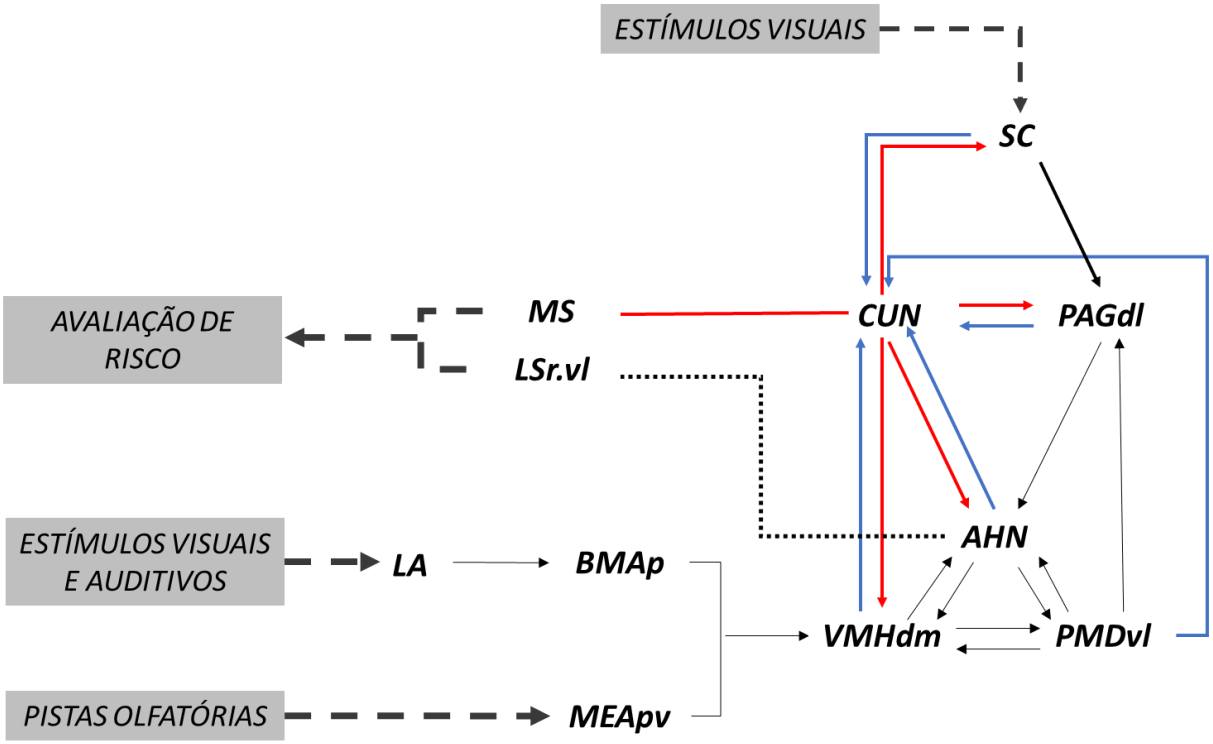

Figura 16- Possível circuito neural envolvido na organização das respostas de avaliação de risco frente ao predador. Modificado de Canteras e Graeff, 2014. Setas vermelhas representam as eferências do núcleo cuneiforme, enquanto as setas azuis representam as aferências do núcleo cuneiforme. **Abreviações:** AHN: núcleo hipotalâmico anterior; BMAp: parte posterior do núcleo basomedial da amigdala; CUN: núcleo cuneiforme; LA: núcleo lateral da amigdala; LSr.vl: parte ventrolateral do septo lateral rostral; MEApv: parte posteroventral do núcleo medial da amigdala; MS: núcleo septal medial; PAGdl: coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal; PAGvl: coluna ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal; PMDvl: parte ventrolateral do núcleo pré-mamilar dorsal; SC: colículo superior; VMHdm: parte dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo.

6 CONCLUSÃO

Em resumo, através dos resultados obtidos, podemos inferir que o núcleo cuneiforme possui conexões com estruturas importantes para expressão do comportamento de defesa. Dessa forma, postulamos um possível circuito neural envolvido na organização das respostas de avaliação de risco frente ao predador. O colículo superior, importante na percepção visual, através de suas projeções eferentes mobilizaria a coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal e o núcleo cuneiforme que, por sua vez, modularia a geração do ritmo teta no eixo septo-hipocampal através de suas projeções para o núcleo septal medial. O núcleo cuneiforme ainda retroalimentaria a coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal, o núcleo ventromedial hipotalâmico e o núcleo hipotalâmico anterior, que através de suas eferências mobilizaria o septo lateral rostral ventrolateral, que influenciaria a formação hipocampal.

REFERÊNCIAS*

Amaral, D.G.; Kurz, J. An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. J Comp Neurol, 240, 37-59, 1985.

ALHEID, G. F. Extended amygdala and basal forebrain. Ann N Y Acad Sci 985:185-205, 2003.

BAJIC, D.; PROUDFIT, H. K. Projections from the rat cuneiform nucleus to the A7, A6 (locus coeruleus), and A5 pontine noradrenergic cell groups. J Chem Neuroanat.;50-51:11-20, 2013.

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

BERNARD, J. F.; PESCHANSKI, M.; BESSON, J. M. Afferents and efferents of the rat cuneiformis nucleus: an anatomical study with reference to pain transmission. Brain Res 490, 181–185, 1989.

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 125:71-89, 2004.

BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. J Comp Physiol Psychol, 81:281-290, 1972.

BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ, LEE MC, WILLIAMS G. Taming in the wild Norway rats following lesions in the basal ganglia. Physio Behav, 27:995-1000, 1981.

BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. Annu. Rev. Psychol, 39:43-68, 1988.

BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC. Anti-predator defensive behaviors in a visible burrow system. J Comp Psychol, 103:70-82, 1989.

BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ, ROGERS RJ. Pharmacological and neural control of anti-predator defense in rat. Aggres Behav, 16:165-175, 1990.

BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ, ROGERS RJ. Risk assessment and animal models of anxiety. In: Olivier, B.; Mos, J.; Slangen, S.L. (Eds). Animal Models in Pharmacological Sciences, Birkhãuser Verlag: Basel, 117-134, 1991.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14724: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011.

BLANCHARD R. J.; YANG M.; LI C.; GERVACIO A.; BLANCHAR D. C. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 25:587-595, 2001.

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

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

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

CANTERAS, N.S.; GOTO, M. Connections of the Precommissural Nucleus. The journal of comparative neurology, 408:23–45, 1999b.

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

CANTERAS NS, KROON JA, DO-MONTE FH, PAVESI E, CAROBREZ AP. Sensing danger through the olfactory system: the role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. Neurosci Biobehav. Rev., 32(7): 1228-35, 2008.

CANTERAS, N. S.; RESSTEL, L. B.; BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A. DE P.; GUIMARAES, F. S. Neuroanatomy of anxiety. Curr Top Behav Neurosci 2:77-96, 2010.

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

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

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

CHOI, D. C.; FURAY, A. R.; EVANSON, N. K.; OSTRANDER, M. M.; ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. J Neurosci 27:2025-2034, 2007.

CHOU, X. L.; WANG, X.; ZHANG, Z. G.; SHEN, L.; ZINGG, B.; HUANG, J.; ZHONG, W.; MESIK, L.; ZHANG, L. I.; TAO, H. W. Inhibitory gain modulation of defense behaviors by zona incerta. Nat Commun. 20;9(1):1151, 2018.

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

DIELENBERG, R. A.; HUNT, G. E.; MCGREGOR, I. S. “When a rat smells a cat”: the distribution of c-fos expression in rat brain following exposure to a predator odor. Neuroscience; 104:1085-97, 2001.

DONG, H. W.; PETROVICH, G. D.; SWANSON, L. W. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. Brain Res Brain Res Rev 38:192-246, 2001a.

DONG, H. W.; PETROVICH, G. D.; WATTS, A. G.; SWANSON, L. W. Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. J Comp Neurol 436:430-455.2001b.

EDWARDS, S. B. Autoradiographicstudiesoftheprojections of the midbrain reticular formation: descending projections of nucleus cuneiformis. J Comp Neurol161, 341–358, 1975.

EDWARDS, S. B.; OLMOS, J. S. Autoradiographic Studies of the Projections of the Midbrain Reticular Formation: Ascending Projections of Nucleus Cuneiformis. J Comp Neurol, 15;165(4):417-31, 1976.

FANSELOW, M. S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization (eds Depaulis ,A. and Bandler, R.), Plenum, New York 151-173, 1991.

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 the superior colliculus in predatory hunting. *Neuroscience, v.* 165, p. 1–15, 2010.

GRAY, T. S.; PIECHOWSKI, R. A.; YRACHETA, J. M.; RITTENHOUSE, P. A.; BETHEA, C. L.; VAN DE KAR, L. D. Ibotenic acid lesions in the bed nucleus of the stria terminalis attenuate conditioned stress-induced increases in prolactin, ACTH and corticosterone. Neuroendocrinology 57:517-524, 1993.

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

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

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitaryadrenocortical axis. Trends Neurosci 20:78-84, 1997.

ITOH, K.; KONISHI, A.; NOMURA, S.; MIZUNO, N.; NAKAMURA, Y.; SUGUIMOTO, T. Aplication of coupled oxidation reaction to electrón microscopic demonstration of the horsedish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. Brain Research, 175:341-346, 1979.

KOLLACK-WALKER, S.; WATSON, S. J.; AKIL, H. Social stress in hamsters: defeat activates specific neurocircuits within the brain. J Neurosci 17:8842–8855, 1997.

KORTE, S. M.; JAARSMA, D.; LUITEN, P. G.; BOHUS, B. Mesencephalic cuneiform nucleus and its ascending and descending projections serve stress-related cardiovascular responses in the rat. J Auton Nerv Syst41, 157–176, 1992.

LAM, W.; VERBERNE A. J. Cuneiform nucleus stimulation-induced sympathoexcitation: role of adrenoceptors, excitatory amino acid and serotonin receptors in rat spinal cord. Brain Res 757, 191–201, 1997.

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

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

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

MITCHELL, I. J.; DEAN, P.; REDGRAVE, P. The projection from superior colliculus to cuneiform area in the rat. II. Defence-like responses to stimulation with glutamate in cuneiform nucleus and surrounding structures. Exp Brain Res, 72:626-639, 1988.

NETZER, F.; BERNARD, J. F.; VERBERNE, A. J. M.; HAMON, M.; CAMUS, F.; BENOLIEL, J. J.; SEVOZ-COUCHE, C. Brain circuits mediating baroreflex bradycardia inhibition in rats: an anatomical and functional link between the cuneiform nucleus and the periaqueductal grey. J Physiol, 589.8, pp 2079–2091, 2011.

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

PETROVICH, G. D.; CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior system. Brain Res Rev; 38:247-89, 2001.

REDGRAVE, P.; MITCHELL, I. J.; DEAN, P. Descending projections from the superior colliculus in rat: a study using orthograde transport of wheat-germ-agglutinin conjugated horseradish peroxidase. Exp Brain Res 68:147–167, 1987.

RESSTEL, L. B.; ALVES, F. H.; REIS, D. G.; CRESTANI, C. C.; CORREA, F. M.; GUIMARAES, F. S. Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. Neuroscience 154:869876, 2008.

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

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

SANDNER, G.; OBERLING, P.; SILVEIRA, M. C.; DI SCALA, G.; ROCHA, B.; BAGRI, A.; DEPOORTERE, R. What brain structures are active during emotions? Effects of brain stimulation elicited aversion on c-fos immunoreactivity and behavior. Behavioural Brain Research, 58, 9-18, 1993.

SWANSON, L.W. Brain maps: structure of the rat brain. Elsevier, Amsterdam, 2004.

Tsanov, M. Differential and complementary roles of medial and lateral septum in the orchestration of limbic oscillations and signal integration. Eur J Neurosci. 2017.
TSANOV, M.; CHAH, E.; REILLY, R.; O'MARA, S.M. Respiratory cycle entrainment of septal neurons mediates the fast coupling of sniffing rate and hippocampal theta rhythm. Eur J Neurosci, 39, 957-974, 2014.

VERTES, R. P. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. Neuroscience 142:1-20, 2006.

VIANNA, D. M. L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M. L. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear, *Neurosci Biobehav Rev*, 25: 711-719, 2001.

VIANNA, D. M. L.; BORELLI, K. G.; FERREIRA-NETTO, C.; MACEDO, C. E.; BRANDÃO, M. L. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. Brain Research Bulletin 62: 179–189, 2003.

ZEMLAN, F. P.; BEHBEHANI, M. M. Nucleus cuneiformis and pain modulation: anatomy and behavioral pharmacology. Brain Research, 453, 89-102, 1988.

WAINER, B.H.; LEVEY, A.I.; RYE, D.B.; MESULAM, M.M.; MUFSON, E.J. Cholinergic and noncholinergic septohippocampal pathways. Neurosci Lett, 54, 45-52, 1985.