

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

DANILO BENETTE MARQUES

**Investigação de correlatos neurais de estratégias de  
enfrentamento ao estresse na atividade oscilatória da rede  
mesolímbica-hipocampo-frontocortical**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2021

DANILO BENETTE MARQUES

**Investigação de correlatos neurais de estratégias de  
enfrentamento ao estresse na atividade oscilatória da rede  
mesolímbica-hipocampo-frontocortical**

**Versão corrigida.**

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
de Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo, como parte das exigências para a  
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. João Pereira Leite

Co-orientador: Dr. Rafael Naime Ruggiero

RIBEIRÃO PRETO – SP

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Marques, Danilo Benette

Investigação de correlatos neurais de estratégias de enfrentamento ao estresse na atividade oscilatória da rede mesolímbica-hipocampo-frontocortical. Ribeirão Preto, 2021.

148 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia, Eletrofisiologia e Comportamento. Versão corrigida.

Orientador: Leite, João Pereira.

Co-orientador: Ruggiero, Rafael Naime.

1. Depressão. 2. Ansiedade. 3. Medo. 4. Estresse. 5. Resiliência. 6. Enfrentamento. 7. Modelos animais. 8. Controlabilidade. 9. Segurança. 10. Valência. 11. Mesolímbico. 12. Amígdala. 13. Hipocampo. 14. Córtex pré-frontal. 15. Eletrofisiologia. 16. Potenciais de campo locais. 17. Inteligência artificial.

NOME: MARQUES, Danilo Benette

TÍTULO: Investigação de correlatos neurais de estratégias de enfrentamento ao estresse na atividade oscilatória da rede mesolímbica-hipocampo-frontocortical.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em:

### **Banca examinadora**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_ **Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_ **Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_ **Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

*Dedico à minha família, Eliana, Airton, Felipe e Júlia pelas lições sobre resiliência  
mais valiosas do que as que eu poderia ter por qualquer experimento científico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Ao Prof. Dr. Adriano Bretanha Lopes Tort, à Profa. Dra. Deborah Suchecki e ao Prof. Dr. Newton Sabino Canteras por terem aceitado o convite para a avaliação deste trabalho. A participação dos professores é um privilégio e tem grande significado para mim e para nosso grupo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Pereira Leite, pela confiança desde minha iniciação científica, que hoje já somam 10 anos. Agradeço por inspirar e viabilizar a busca por uma neurociência 100% brasileira, inovadora e de qualidade. Também agradeço pelo entusiasmo, autonomia e puxões de orelha.

Ao meu co-orientador e mentor científico, Dr. Rafael Naime Ruggiero, pela supervisão, parceria, discussões, cobranças, confiança e amizade. Agradeço pelo companheirismo nesta jornada conjunta de grandes aprendizados, desafios, frustrações e conquistas.

Ao Dr. Matheus Teixeira Rossignoli pela realização dos principais trabalhos paralelos que apoiam esta tese, pelo trabalho excepcional nas figuras do artigo I, pelas discussões teóricas determinantes, pela amizade e pelas conversas consoladoras e motivadoras.

Aos demais autores dos trabalhos citados aqui. Ao Bruno de Avó Mesquita pela confiança e parceria próxima durante a realização de sua iniciação científica e pela colaboração, teórica e prática, no desenvolvimento dos aparatos e desenhos comportamentais. Ao Benedito de Oliveira Júnior pela ajuda no desenvolvimento dos aparatos comportamentais e na elaboração das figuras apresentadas no apêndice. Ao Leonardo Rakauskas Zacharias pela ajuda com o sistema Open Ephys e compartilhamento de seu vasto expertise em gambiarras. À Tamiris Prizon pelas incontáveis ajudas técnicas e prosas reconfortantes. Ao Lézio Soares Bueno Júnior pela ajuda na escrita do artigo I. Ao Fernando Figueiredo Mecca pela confiança e investigação dos efeitos de antidepressivos.

Ao Prof. Dr. Frederico Guilherme Graeff, ao Prof. Dr. Nuno Sousa e à Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan pelas ricas discussões acerca dos desenhos experimentais, significados comportamentais, circuitos neurais e perspectivas futuras.

Ao Luis Fernando Luca pela contribuição imprescindível no desenvolvimento do aparato de esQUIVA ativa para registro eletrofisiológico de qualidade, pelos ensinamentos básicos de eletrônica e pela melhor cerveja artesanal de Ribeirão Preto.

Ao Eliseu e ao Roger pela customização mecânica dos aparatos comportamentais descritos no apêndice.

Ao técnico, Antônio Renato Meirelles e Silva, pelas incontáveis ajudas cotidianas, sugestões técnicas e pela competência na administração da infraestrutura onde este trabalho foi realizado.

Às técnicas, Renata Scandiuzzi e Daniela Cristina Borges Ribeiro, pelas ajudas cotidianas diversas, disposição e pelas preparações histológicas.

À secretária da pós-graduação, Luci Rose Nassif Menezes, pela eficiência exemplar, simpatia adorável e orientações.

A todos os demais colegas do Laboratório de Investigação em Epilepsia, José Luiz, Rafael D'Agosta, Ana Paula Crestani e Isabella Dias pelas ajudas, incentivos e boas conversas durante os cafezinhos na copa.

Aos grupos de Whatsapp: "Hoje tem labmeeting?", "Seminário da Tiana", "Não", "Teresa Jobs", "Wingmen" e ao amigo Murilo Pastana pela amizade, mas, principalmente, pelas figurinhas e memes. Também agradeço aos colegas de apartamento Renan Henrique de Oliveira e Verônica Lima de Faria pela boa convivência.

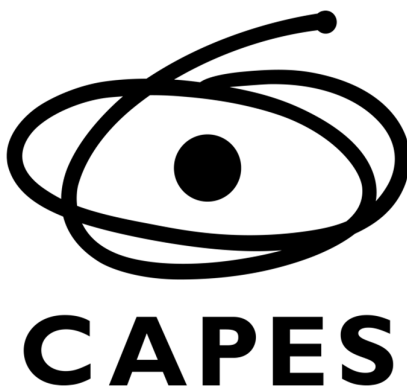
À Profa. Dra. Elisabeth Spinelli de Oliveira, à Casa da Ciência do Hemocentro de Ribeirão Preto, à Liga Acadêmica de Neurociências e Comportamento e à comissão organizadora da 6ª edição do Curso de Inverno em Neurociências pelas oportunidades de divulgação científica.

À família Noronha Ferraz de Arruda, Teresinha, Homero, Carol, Marina, Clara, Leandro e Amora, pela hospitalidade inigualável, acolhimento e excelentes marmitas.

À minha mãe Eliana, ao meu pai Airton e ao meu irmão Felipe pelo apoio incondicional, suporte nos momentos de dificuldade e partilha dos momentos de comemoração. Também agradeço à minha sobrinha Mia pela fofura.

À minha nena Júlia. Agradeço pelo amor, parceria, cuidados e cookies. Agradeço por ser meu suporte, meu sinal de segurança e minha motivação durante estes anos. Também agradeço pelas reflexões sobre a complexidade do contexto clínico que apontaram a enorme relevância da variabilidade individual associada à vulnerabilidade e resiliência em saúde mental. Obrigado, nena.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pela concessão da minha bolsa. Agradeço à CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da infraestrutura utilizada neste trabalho.



O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88882.328283/2019-01.



“He said: ‘I admire your work. You’ve been using the tools of modern neuroscience to study depression, and anxiety, and fear. Why can’t you use those same tools to study positive qualities, like kindness and compassion?’

...I did not have a very good answer.”

Relato do neurocientista Dr. Richard Davidson  
sobre sua conversa pessoal com SS Dalai Lama

## RESUMO

MARQUES, D.B. **Investigação de correlatos neurais de estratégias de enfrentamento ao estresse na atividade oscilatória da rede mesolímbica-hipocampo-frontocortical.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A expectativa de controle sobre estressores, a diferenciação de situações de estresse ou segurança e a avaliação de potenciais ameaças ou recompensas são fundamentais para o enfrentamento adaptativo ao estresse e saúde mental. Neste trabalho tivemos o objetivo de identificar padrões multivariados de atividade de potenciais de campo locais de redes neurais amplas subjacentes a comportamentos relacionados à resiliência em ratos. Para identificar correlatos neurais da controlabilidade, investigamos a atividade da rede hipocampo-córtex pré-frontal (HPC-PFC) em animais expostos a choques controláveis, incontroláveis ou sem choques sinalizados por um estímulo condicionado (CS). Identificamos um padrão constituído do aumento das potências e maior sincronia em teta (4-10 Hz) da rede HPC-PFC durante CS e maior acoplamento teta-gama (80-110 Hz) basal no PFC que acuradamente predizia animais resistentes a futuros estressores (Artigo I). Para identificar correlatos neurais de segurança e valência, investigamos a atividade de sete regiões da rede mesolímbica-hipocampo-frontocortical (MLHFC) durante um CS associado à ausência (segurança) e à antecipação (medo) de choques, e em um teste de aproximação-esquiva. Usando aprendizado de máquina, identificamos padrões caracterizados pelo aumento da sincronia em teta na rede MLHFC durante medo e precedendo aproximação (Artigo II). Ademais, desenvolvemos dispositivos de registro comportamental que revelaram que nado forçado, consumo de sacarose e interação social exibem ritmicidade motora nas frequências teta (Apêndice). Concluímos que padrões de atividade oscilatória encefálica relacionados às oscilações teta são subjacentes a estratégias adaptativas ativas de enfrentamento ao estresse. Sugerimos que oscilações neurais são importantes na neurobiologia da resiliência e que poderiam guiar o desenvolvimento de novos tratamentos psiquiátricos.

**Palavras-chave:** Depressão. Ansiedade. Medo. Estresse. Resiliência. Enfrentamento. Modelos animais. Controlabilidade. Segurança. Valência. Mesolímbico. Amígdala. Hipocampo. Córtex pré-frontal. Eletrofisiologia. Potenciais de campo locais. Inteligência artificial.

## ABSTRACT

MARQUES, D.B. **Investigation of neural correlates of stress coping strategies in the mesolimbic-hippocampal-frontocortical network oscillatory activity.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The expectation of control over stressors, the ability to differentiate situations of stress or safety, and the assessment of potential threats or rewards are fundamental to mental health. Here, we aimed to identify multivariate activity patterns of local field potentials of large-scale neural networks underlying behavioral states related to resilience in rats. To identify neural correlates of controllability, we investigated the activity of the hippocampal-prefrontal cortical (HPC-PFC) network in animals exposed to controllable, uncontrollable, or no-shocks signaled by an identical conditioned stimulus (CS). We identified a pattern consisting of increased theta (4-10 Hz) power and greater synchrony in the HPC-PFC network during CS and greater basal theta-gamma coupling (80-110 Hz) in the PFC that accurately predicted animals resistant to future stressors. (Article I). To identify neural correlates of safety and valence, we investigated the activity of seven regions of the mesolimbic-hippocampal-frontocortical (MLHFC) network during a CS associated with the absence (safety) and then to the anticipation (fear) of shocks, and during an approach-avoidance test. Using machine learning, we identified patterns characterized by increased theta synchrony in the MLHFC network during fear and preceding approach (Article II). In addition, we developed behavioral recording devices that revealed that forced swimming, sucrose consumption and social interaction exhibit motor rhythmicity at the same frequencies as theta (Appendix). We conclude that patterns of brain-wide oscillatory activity related to theta oscillations underlie adaptive active stress coping strategies. We suggest the inclusion of neural oscillations as relevant components of the neurobiology of resilience and that these patterns can guide the development of new psychiatric treatments.

**Keywords:** Depression. Anxiety. Fear. Stress. Resilience. Coping. Animal models. Controllability. Safety. Valence. Mesolimbic. Amygdala. Hippocampus. Prefrontal cortex. Electrophysiology. Local field potentials. Artificial intelligence.

## Lista de abreviaturas e siglas

a.u.	unidade arbitrária ( <i>arbitrary unit</i> )
AA	aproximação-esquiva ( <i>approach-avoidance</i> )
ACC	acelerômetro
AMG	amígdala ( <i>amygdala</i> )
ANN	rede neural artificial ( <i>artificial neural network</i> )
ANOVA	análise de variância
AP	aproximação ( <i>approach</i> )
APA	<i>American Psychological Association</i>
AUC	área sob a curva ( <i>area under the curve</i> )
AV	esquiva ( <i>avoidance</i> )
BS	entre sujeitos ( <i>between-subject</i> )
CA1	<i>cornu Ammonis 1</i>
CA3	<i>cornu Ammonis 3</i>
COH	coerência ( <i>coherence</i> )
CS	estímulo condicionado ( <i>conditioned stimulus</i> )
DH	hipocampo dorsal ( <i>dorsal hippocampus</i> )
DIR	direcionalidade/diferença de fase ( <i>directionality/phase difference</i> )
EC	córtex entorrinal ( <i>entorhinal cortex</i> )
EEG	eletroencefalograma
EMP	esquiva mediada por plataforma
ES	choques escapáveis ( <i>escapable shocks</i> )
GLM	modelo linear generalizado ( <i>generalized linear model</i> )
H	desamparado ( <i>helpless</i> )
HPC	hipocampo ( <i>hippocampus</i> )
IKI	intervalo entre chutes ( <i>inter-kick interval</i> )
IL	área infralímbica ( <i>infralimbic area</i> )
ILI	intervalo entre lambidas ( <i>inter-lick interval</i> )
IR	infravermelho
IS	choques inescapáveis ( <i>inescapable shocks</i> )
ISI	intervalo entre estímulos ( <i>interstimulus interval</i> )
ITC	coerência entre ciclos ( <i>intertrial coherence</i> )
LCE	labirinto em cruz elevado
LFP	potenciais de campo locais ( <i>local field potentials</i> )
LM	modelo linear ( <i>linear model</i> )
LMPC	modelo linear treinado em componentes principais
LMUV	modelo linear treinado em dados univariados
LSD	<i>Fisher's least significant difference</i>
MI	índice de modulação ( <i>modulation index</i> )
MLHFC	mesolímbica-hipocampo-frontocortical ( <i>mesolimbic-hippocampal-frontocortical</i> )
MPC	coerência de fase média ( <i>mean phase coherence</i> )
MRL	comprimento resultante da média ( <i>mean resultant length</i> )
MV	multivariada
NAc	núcleo accumbens ( <i>nucleus accumbens</i> )
NIMH	<i>National Institute of Mental Health</i>
NS	sem choques ( <i>no shocks</i> )
O-LM	<i>oriens-lacunosum moleculare</i>
PC	componente principal ( <i>principal component</i> )

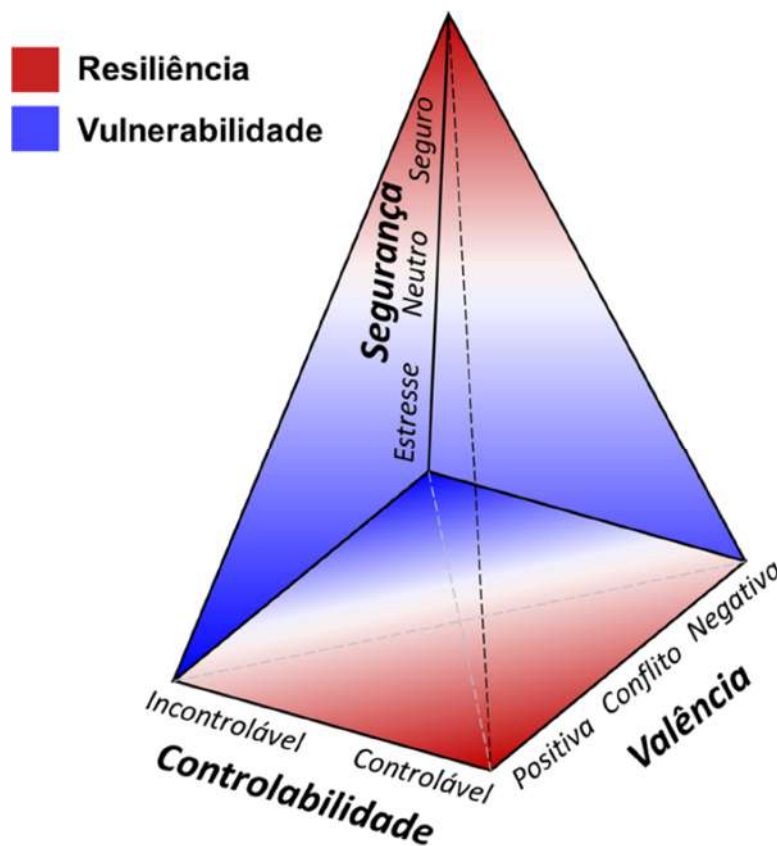
PCA	análise de componentes principais ( <i>principal component analysis</i> )
PFC	córtex pré-frontal ( <i>prefrontal cortex</i> )
PL	área prelímbica ( <i>prelimbic area</i> )
PPC	<i>pairwise phase consistency</i>
PWR	potência ( <i>power</i> )
R	resistente ( <i>resistant</i> )
RDoC	<i>Research Domain Criteria</i>
REM	<i>rapid eye movement</i>
RM	medidas repetidas ( <i>repeated measures</i> )
ROC	curva característica de operação do receptor ( <i>receiver operating characteristics curve</i> )
STA	média engatilhada por disparos ( <i>spike triggered average</i> )
TBS	<i>theta-burst stimulation</i>
t-SNE	incorporação de vizinho estocástico distribuído em t ( <i>t-distributed stochastic neighbor embedding</i> )
US	estímulo não-condicionado ( <i>unconditioned stimulus</i> )
UV	univariada
VH	hipocampo ventral ( <i>ventral hippocampus</i> )
vs.	<i>versus</i>
VTA	área tegmental ventral ( <i>ventral tegmental area</i> )
WS	intrassujeito ( <i>within-subject</i> )

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1. Ciência e depressão: de demônios à inteligência artificial</b> .....	17
<b>1.2. A distinta neurobiologia da resiliência</b> .....	23
<b>1.3. Dimensões psicobiológicas do enfrentamento ao estresse</b> .....	28
1.3.1. <i>Controlabilidade</i> .....	31
1.3.2. <i>Segurança</i> .....	35
1.3.3. <i>Valência</i> .....	39
<b>1.4. Oscilações teta e enfrentamento ao estresse: do bem ou do mal?</b> .....	43
1.4.1. <i>Origem e função: ligando redes neurais</i> .....	44
1.4.2. <i>Funções cognitivas e sensorio-motoras</i> .....	48
1.4.3. <i>Funções emocionais: relações com medo, ansiedade e depressão</i> .....	50
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	58
<b>2.1. Objetivos gerais</b> .....	58
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	58
<b>3. ARTIGOS</b> .....	59
<b>3.1. ARTIGO I - Correlatos neurais da controlabilidade sobre o estresse</b> .....	59
<b>3.2. ARTIGO II - Correlatos neurais de segurança e valência sobre o estresse</b> .....	77
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	117
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	120
<b>6. APÊNDICE - Desenvolvimento de sistemas de registro para estudo da relação entre oscilações neurais e comportamentos inatos relevantes para depressão</b> .....	133

## 1. INTRODUÇÃO

Indivíduos diferem em como percebem e lidam com adversidades. A expectativa de controle ou de falta de controle, a capacidade de discernir situações de estresse ou de segurança, e a percepção equilibrada de potenciais ameaças ou recompensas são elementos fundamentais na determinação de estratégias de enfrentamento adaptativas ou mal-adaptativas ao estresse, que definem resiliência ou vulnerabilidade, respectivamente (LAZARUS; FOLKMAN, 1984; SOUTHWICK; CHARNEY, 2012) (Fig. 1). Enquanto desequilíbrios em direção a estratégias mal-adaptativas são marcas de condições clínicas de sofrimento mental, como depressão, ansiedade e trauma, a adoção de estratégias adaptativas é associada a bons resultados clínicos e melhor qualidade de vida em geral (FEDER et al., 2019; MAIER; SELIGMAN, 2016). Este trabalho investigou as dinâmicas de redes neurais envolvidas nestes processos.



**Figura 1** – Dimensões psicobiológicas que definem estilos de avaliação e estratégias de enfrentamento relacionados à resiliência ou vulnerabilidade ao estresse.

Esta tese é uma continuação direta da investigação iniciada durante meu mestrado em busca de correlatos eletrofisiológicos de fatores psicológicos<sup>1</sup> envolvidos no enfrentamento ao estresse em modelos animais. Em minha dissertação criticamos desenhos experimentais que comparam indivíduos com comportamento depressivo induzido por estresse, indivíduos não-estressados e indivíduos tratados com antidepressivos para identificação de marcadores biológicos relacionados à depressão, uma vez que os efeitos generalizados do estresse *per se* representam uma variável de confusão. Então, argumentamos que a distinção entre indivíduos resilientes e suscetíveis ao estresse seria uma forma apropriada para se compreender a neurobiologia subjacente à resiliência e depressão. Também criticamos a abordagem predominante na neurociência da depressão, de que esta seria associada a disfunções moleculares específicas (*hipótese do desequilíbrio químico*), e defendemos a perspectiva que considera uma neurobiologia mais complexa envolvendo a função de circuitos distribuídos no processamento de informações (*hipótese da rede neural*) (CASTRÉN, 2005). Achados acidentais em nosso laboratório nos remeteram a estudos comportamentais clássicos que nos indicaram a *controlabilidade* sobre estímulos aversivos, um fator “psicológico”, como a informação determinante de resiliência ou vulnerabilidade. Adaptamos um aparato de esquiva ativa para registro eletrofisiológico simultâneo e investigamos as atividades do hipocampo (HPC) intermediário e do córtex pré-frontal (PFC, *prefrontal cortex*), regiões amplamente associadas à depressão e ao controle sobre o estresse, durante a exposição a choques escapáveis ou inescapáveis sinalizados. A descoberta de que ratos expostos a choques escapáveis apresentam um aumento das potências e coerência na faixa de 5-10 Hz, a qual corresponde às oscilações teta, e de que ratos expostos a choques inescapáveis apresentam uma redução desta atividade (Fig. 2), marca a conclusão do meu mestrado (MARQUES, 2016) e início das investigações realizadas durante meu doutorado que serão apresentadas nesta tese.

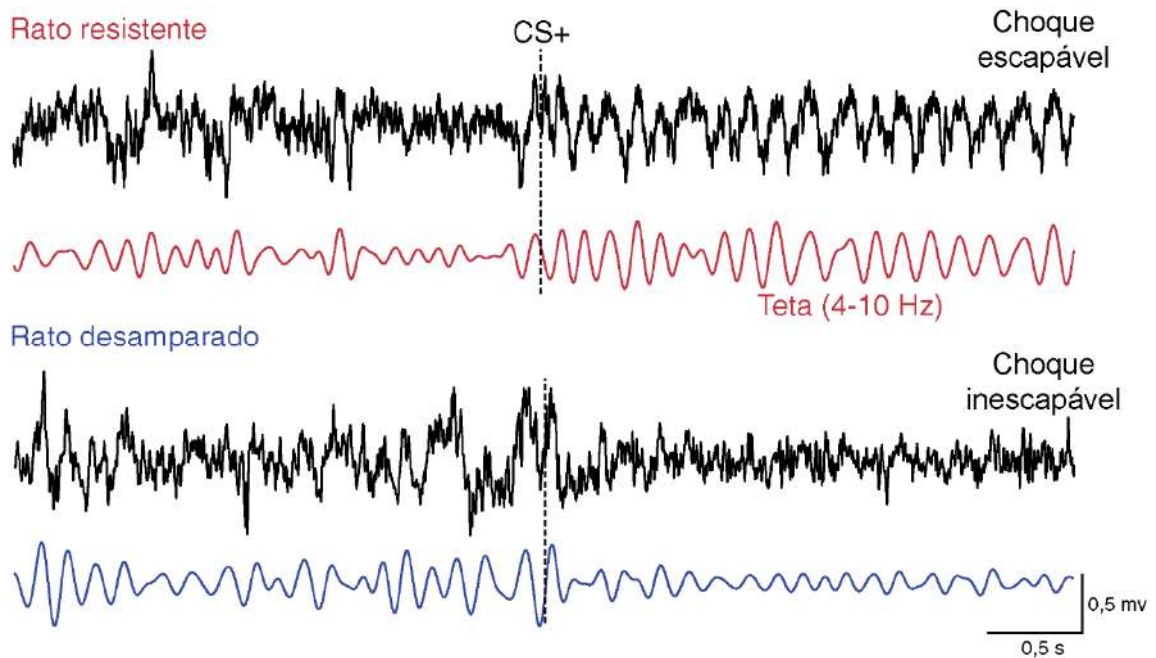
Desde então, as concepções acima passaram por correções, atualizações, ganharam novas ênfases ou nos redirecionaram a novos caminhos de investigação. A seguir, apresentarei uma revisão crítica da literatura apontando estas novas considerações e citarei achados complementares de trabalhos que colaborei que

---

<sup>1</sup> Relacionados à cognição, emoção, motivação e experiência ou que não sejam explicados por propriedades físicas.



fundamentam a realização e interpretação dos estudos originais que serão apresentados aqui. Os estudos serão apresentados no formato de coletânea de artigos (artigos I e II) e um apêndice. Por fim, apresentarei as conclusões sobre a identificação, significados e implicações dos correlatos oscilatórios de estratégias de enfrentamento ao estresse investigados aqui.



**Figura 2** – Traços representativos mostrando a modulação oposta da expectativa de controle ou de falta de controle sobre um estímulo aversivo sobre as oscilações teta no hipocampo. Linhas pretas = potenciais de campo locais. Linhas vermelha e azul = potenciais de campo locais filtrados em 4-10 Hz. CS = *conditioned stimulus*.

### 1.1. Ciência e depressão: de demônios à inteligência artificial

A depressão maior é uma das principais causas de incapacidade no mundo (ABBAFATI et al., 2020). A insegurança constante diante uma ameaça invisível, a impotência em relação a um possível contágio e o distanciamento de entes queridos e atividades prazerosas decorrentes da pandemia de COVID-19, nos últimos dois anos, aumentou a prevalência dos transtornos de humor e de ansiedade globalmente (SANTOMAURO et al., 2021). Apesar do esforço, interesse, financiamento e esperança dos pacientes em sofrimento, a eficácia de tratamentos para depressão progrediu pouco nos últimos anos (KESSLER et al., 2005).

A depressão clínica é diagnosticada pela presença prolongada e simultânea de cinco, de uma lista de nove, sintomas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION,

2014), mas pode ser manifestada por humor deprimido, perda de interesse, anedonia, sofrimento psíquico, pessimismo, baixa autoestima, culpabilidade, desesperança, desamparo, hipocondria, dificuldade de concentração, dificuldade no trabalho, dificuldade de tomar iniciativas, indecisão, ruminação, ideação e comportamento suicida, despersonalização, desrealização, fala lenta com linguagem pobre e exagerada, alterações psicomotoras, fadiga, ansiedade e medo exagerados e obsessivos, mudanças no apetite e peso, alterações no sono e ritmo circadiano, bem como uma diversidade de sintomas corporais (KENDLER, 2016). Esta multitude de domínios afetados concomitantemente na depressão levou a propostas de sua etiologia predominantemente baseadas em mecanismos biológicos que afetam o encéfalo, ou o corpo, como um todo. Este ponto de vista é presente desde as atribuições de possessão demoníaca à hipótese do excesso de bile escura por Hipócrates na idade antiga (BURTON, 1621), até às hipóteses modernas propostas após a descoberta da neurotransmissão central. Nesta perspectiva, transtornos de humor já foram associados a desequilíbrios na produção e sinalização de neurotransmissores moduladores centrais (COPPEN, 1967; SCHILDKRAUT, 1965), excesso e cronicidade de atividade hormonal (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005), mediadores e substratos moleculares de plasticidade neural (DUMAN; HENINGER; NESTLER, 1997; DUMAN; MONTEGGIA, 2006), mecanismos inflamatórios (DANTZER et al., 2008), diversidade da microbiota intestinal (KELLY et al., 2016), diferenças genéticas e epigenéticas (CASPI et al., 2003; KRISHNAN; NESTLER, 2008) entre outras.

Por outro lado, Bejjani et al. (1999) descreveram uma paciente com Mal de Parkinson submetida a implante de estimulação profunda, o qual evocava comportamentos e sentimentos de profunda tristeza quando ligado, que cessavam imediatamente quando desligado, sugerindo bases neurais mais delimitadas no comportamento depressivo (HAN; NESTLER, 2017). Neste sentido, a neurociência testemunhou, nos últimos 15 anos, um progresso marcante em técnicas que objetivam a delimitação de regiões, subtipos celulares e projeções específicas para se investigar seus papéis comportamentais, com especial importância à ascensão e difusão da optogenética. Estudos com optogenética já foram capazes de modular, promover ou inibir diversos comportamentos associados a depressão em modelos experimentais (BAGOT et al., 2015; CHAUDHURY et al., 2012; COVINGTON et al., 2010; LAMMEL;

TYE; WARDEN, 2014; POST; WARDEN, 2018; TYE et al., 2013; WARDEN et al., 2012). De fato, a contribuição destas técnicas para a compreensão dos circuitos neurais envolvidos nestes comportamentos é inquestionável.

No entanto, tanto a perspectiva de alterações que afetam o cérebro de forma *global*, quanto a dissecção de circuitos específicos, que apoiam uma noção *localizacionista-conectista* da função neural, não explicam como várias funções estão comprometidas concomitantemente nos transtornos relacionados ao estresse (HEADLEY et al., 2019). Além disso, contando a contribuição significativa em paralelo das duas abordagens, ainda é pouco claro como estes diferentes níveis de processamento podem estar, na verdade, relacionados. Neste sentido, as duas abordagens, separadamente, não abrangem a complexidade da integração funcional de múltiplas regiões no processamento neural possivelmente envolvida na depressão, a qual só poderia ser evidenciada por uma investigação sofisticada de correlatos neurais (HEADLEY et al., 2019). Estudos com neuroimagem funcional em humanos têm demonstrado a atividade conjunta de múltiplas regiões distribuídas no encéfalo durante processamentos cognitivos, emocionais e em psicopatologias, indicando a existência e relevância de *redes neurais de larga escala* (BRESSLER; MENON, 2010; MENON, 2011). Williams (2016) argumenta que alterações em funções associadas a algumas destas redes mais bem estabelecidas (i.e., modo padrão, saliência, afetos positivo e negativo, atenção e controle cognitivo) correspondem a sintomas específicos da depressão e ansiedade, o que sugere que a etiologia de tais condições poderia estar associada a disfunções destas redes neurais amplas (GOLDSTEIN-PIEKARSKI et al., 2021). No entanto, os mecanismos que promovem a *ligação* funcional destas redes é incerto e a complexidade inerente desta abordagem demanda um refinamento nas ferramentas de análise.

Arvid Carlsson, principal nome envolvido na descoberta da neurotransmissão central, na conclusão de sua palestra de recebimento do Prêmio Nobel em 2000, reconhece o domínio que a neurobiologia molecular teve nos anos anteriores mas enfatiza que “o cérebro não é uma fábrica de químicos, mas uma máquina de sobrevivência extremamente complexa” e previu o grande foco na investigação de circuitos neurais que ocorreu nos anos seguintes. Porém, ainda mais marcante, foi o prenúncio de um novo paradigma, atualmente se estabelecendo na neurociência, que

promete lidar com a complexidade cerebral e individual que as abordagens anteriores não compreenderam:

*During the past half-century brain research has been dominated by biochemical approaches, in contrast to the previous half-century, which had a strong electrophysiological emphasis. This switch is understandable in view of the entrance of the neurohumoral transmission concept into brain research in conjunction with the spectacular progress of molecular biology. However, it must be recognized that the brain is not a chemical factory but an extremely complicated survival machine.*

*In order to bring all the forthcoming biochemical observations into a meaningful framework it will prove necessary to emphasize more strongly aspects of neurocircuits and connectivity and to do so both at the microscopic and macroscopic level. For example, the old questions dealing with neurocircuits within a cerebral region such as the cortex and those addressing the interaction between the different regions will in all probability come into focus more strongly in order to make full use of the new knowledge gained from neurotransmitter physiology and molecular biology.*

*Here the new imaging techniques in conjunction with advanced computer-dependent statistics involving pattern recognition derived from a wealth of data with great complexity will probably prove extremely useful and very much help to bridge the gap between animal and human observations. If nothing else, such approaches will help to reveal the enormous width of our present ignorance of the human brain. (CARLSON, 2000 - Nobel Lecture [s.d.]).*

O uso de técnicas computacionais de reconhecimento de padrão e classificação, comumente nomeadas como inteligência artificial ou *aprendizado de máquina*, tem ganhado enorme relevância nos últimos anos na ciência (HEY; TANSLEY; TOLLE, 2009), na pesquisa médica (JOSEPHSON; WIEBE, 2021) e na neurociência (VU et al., 2018). O aprendizado de máquinas é um conjunto de técnicas<sup>2</sup> de análise de dados, originalmente descritas como envolvendo a “programação de um computador para se comportar de maneira que, se feita por humanos ou animais, seria descrita como envolvendo o processo de aprendizagem” (SAMUEL, 1959), as quais podem ser divididas em duas abordagens principais: o aprendizado *não-supervisionado* e o *supervisionado*.

---

<sup>2</sup> Nesta seção menciono apenas os métodos que foram utilizados nos trabalhos apresentados aqui.

No aprendizado não-supervisionado, procura-se descobrir padrões de relações “naturais” nos dados sem os algoritmos serem informados sobre que está se tentando classificar ou prever. Assim, buscam-se combinações entre variáveis relacionadas (e.g., atividades de regiões, níveis moleculares ou expressão de genes) ou agrupamentos de observações (e.g., indivíduos, épocas ou doenças). Uma estratégia desta abordagem é a *redução de dimensionalidade*, a qual procura agrupar variáveis correlacionadas ou redundantes de modo a representarem suas variações coletivas por um número menor de fatores latentes. As técnicas mais comuns são a análise de componentes principais (PCA, *principal component analysis*) e análise fatorial. Na PCA, procura-se identificar as variações coletivas dos dados que mais explicam a variância total. A análise ranqueia componentes principais (PC) de acordo com a quantidade de variância explicada, o que permite a interpretação de que os primeiros componentes explicam a variabilidade relevante enquanto os últimos contêm principalmente ruído estatístico. Outro aspecto útil da redução de dimensões é a possibilidade de apresentação gráfica, considerando até três fatores, a qual pode revelar propriedades interessantes da forma dos dados. Um exemplo interessante, foi que a projeção gráfica da PCA de dados genéticos de um corte diverso de populações da Europa espelhavam a distribuição geográfica destas populações no continente (NOVEMBRE et al., 2008). A análise fatorial é amplamente usada em dados psicométricos e tem o objetivo de identificar variáveis correlacionadas que formam fatores latentes, mas esta se dá após designação do número de fatores hipotetizados pelo pesquisador e não se importa em ranquear a variância. Ela foi desenvolvida por Charles Spearman para investigar a existência de um fator geral da inteligência, mas posteriormente desenvolvida para identificar múltiplos tipos (BARTHOLOMEW, 1995). Outra abordagem é a identificação de agrupamentos (*clusters*) de observações. Para isso, os métodos mais utilizados são o agrupamento por *k*-médias e a aglomeração hierárquica. Este último, adicionalmente permite visualizar quais agrupamentos são mais similares entre si.

Enquanto isso, no aprendizado supervisionado, o algoritmo usa a informação dos rótulos, dada pelo pesquisador, de quais observações (e.g., indivíduos ou épocas) são de quais classes (e.g., grupos experimentais, categorias comportamentais ou diagnósticos) e, então, usa os dados das múltiplas variáveis, também chamadas de *atributos*, para classificar tais observações. Hoje existem diversos algoritmos para

esse objetivo, sendo os mais clássicos o modelo linear discriminante e a regressão logística, e dentre os mais utilizados atualmente se destacam as redes neurais artificiais. Nesta abordagem, o método mais tradicional se baseia no *treino* do modelo em um conjunto de dados e *teste* do modelo em novos dados como forma de avaliar a *generalização* da performance do modelo. Como muitos destes métodos se baseiam em regressões, por via de regra, quanto maior o número de atributos, melhor é a performance de um modelo nos dados de treino, mas que pode levar a uma pobre generalização, fenômeno conhecido como sobreajuste. Algumas formas de contornar esta questão são pela maximização do número de observações, redução do número de variáveis e evitando variáveis que são muito correlacionadas entre si (multicolinearidade). Em convergência, tanto na abordagem supervisionada quanto na não-supervisionada, podem ser reconhecidos padrões de combinações lineares entre múltiplas variáveis. O quanto cada observação corresponde à variação de cada padrão é dada por escores, enquanto as relações entre variáveis são representadas por coeficientes, que mostram o peso de cada variável, bem como as relações positivas ou negativas entre elas. Estes padrões que envolvem a relevância de muitas variáveis simultaneamente são denominados *padrões multivariados*.

O aprendizado de máquinas é útil tanto para investigar variabilidade comportamental quanto de padrões de atividade de redes neurais (i.e., variações coletivas de atividades correlacionadas entre múltiplas regiões). O diagnóstico da depressão maior pelo DSM-5, i.e., cinco de nove sintomas, implica que dois indivíduos podem receber o mesmo diagnóstico tendo apenas um sintoma em comum, o que revela a heterogeneidade da condição. De fato, a depressão maior é o transtorno psiquiátrico mais investigado em abordagens de aprendizado de máquina para identificação de subtipos, potencialmente sensíveis a diferentes tratamentos (MIRANDA et al., 2021). Um estudo de grande destaque, mostrou que diferentes padrões de conectividade funcional por neuroimagem se correlacionaram a medidas coletivas de ansiedade ou anedonia, definindo quatro biotipos de depressão (DRYSDALE et al., 2017). Neste contexto, a ressonância magnética funcional é a técnica mais empregada, mas seu alto custo suplica o desenvolvimento de técnicas não invasivas mais acessíveis para a aplicação e difusão desta abordagem na clínica, como é o caso da eletrofisiologia.

O uso do aprendizado de máquina na neuropsiquiatria aparenta estar no ápice de interesse (JOSEPHSON; WIEBE, 2021). No entanto, sua aplicação traz vantagens, mas também desvantagens inerentes. Conforme as tentativas, sucedidas (e.g. DRYSDALE et al., 2017) e malsucedidas (e.g., DINGA et al., 2019), de replicação, reprodução e interpretação, irão se estabelecendo os métodos mais robustos e revelando as reais contribuições desta tecnologia (dinâmica conhecida como *Gartner hype cycle*). Portanto, o desenvolvimento de métodos reproduzíveis, replicáveis e interpretáveis é crítico para o avanço desta abordagem. Contudo, estudos usando aprendizado de máquina podem revelar, de fato, informações diferentes das análises convencionais sobre a neurofisiologia da depressão e da resiliência?

## 1.2. A distinta neurobiologia da resiliência

Quando elaboramos o desenho experimental do trabalho apresentado no Artigo I, hipotetizamos que encontraríamos marcadores neurofisiológicos dos indivíduos desamparados (i.e., vulneráveis ao estresse). No entanto, após a caracterização eletrofisiológica compreensiva, análises multivariadas e implementação de um modelo de classificação, o que encontramos foi uma assinatura neural que predizia os animais resistentes, enquanto os animais desamparados eram preditos pela ausência desta atividade distintiva<sup>3</sup> (Fig. 3; Artigo I). Em uma entrevista recente, Eric J. Nestler comenta:

*Years ago, most would have thought that resilient individuals escape some of the bad things that stress induces in the brains of more susceptible individuals. [...] Now we believe susceptible individuals lack some of the more adaptive changes that occur in the resilient brain.*

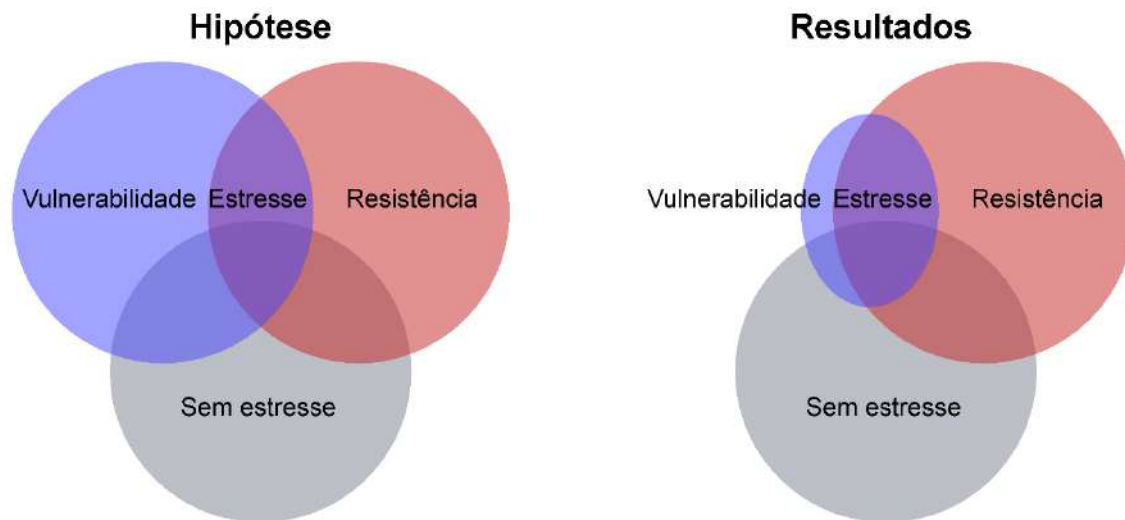
(KING, 2016)

O reconhecimento da resiliência como um processo neurobiológico ativo, único e complexo, merecedor de investigações próprias, é notável pela migração do interesse de pesquisadores responsáveis por importantes contribuições na neurociência do medo, ansiedade e depressão para um foco mais específico nos aspectos adaptativos e positivos. Como exemplo, Eric J. Nestler e colaboradores, um dos principais grupos investigativos da neurobiologia molecular da depressão (e.g. NESTLER et al., 2002), após descobrirem que camundongos resilientes à derrota

---

<sup>3</sup> Ficamos tão entusiasmados com este achado que o nome original, publicado em *preprint*, de nosso Artigo I era “A distinctive pattern of [...] activity predicts learned resistance during stress” (MARQUES et al., 2019)

social apresentavam mais genes regulados em algumas áreas do encéfalo do que animais suscetíveis, se aprofundaram nas distinções genéticas e epigenéticas destes indivíduos, rendendo revisões exclusivas sobre biologia molecular da resiliência (e.g., RUSSO et al., 2012). Outro caso é Richard J. Davidson, que contribuíra com estudos de neuroimagem e eletroencefalografia (EEG) sobre emoções e depressão (e.g., DAVIDSON et al., 2002), depois fundou o Centro de Investigação de Mentes Saudáveis onde estudam, hoje, a neurobiologia da meditação e contemplação (e.g., DAVIDSON; LUTZ, 2008). Por fim, Martin E. Seligman, um dos psicólogos que demonstraram o fenômeno do desamparo aprendido como componente da etiologia da depressão (SELIGMAN, 1975; ver seção 1.3.1.), quando se tornou presidente da *American Psychological Association* (APA), fundou o campo da “Psicologia Positiva”, a qual propõe a investigação científica rigorosa dos aspectos positivos da função mental (SELIGMAN, 2018).



**Figura 3** – Diagramas de Venn representando marcadores neurofisiológicos de resistência ou desamparo hipotetizados e encontrados no Artigo I.

Pouco depois do fim da segunda guerra mundial, foram inaugurados o Departamento de Assuntos de Veteranos, em 1946, e o *National Institute of Mental Health* (NIMH), em 1947, o que incentivou muitos clínicos e cientistas a fazerem suas carreiras no tratamento e pesquisa com foco exclusivo na psicopatologia, abordagem que prevaleceu desde então. Seligman critica a permanência do NIMH, principal instituição de fomento para pesquisas em saúde mental, no modelo psicopatológico e brinca ao sugerir a mudança no nome para “*National Institute of Mental Illness*”



(SELIGMAN; CSIKSZENTMIHALYI, 2000). O foco científico na saúde, e não na doença, é uma mudança de paradigma em andamento (KALISCH; MÜLLER; TÜSCHER, 2015). Apesar do entusiasmo recente, a neurociência da resiliência está em sua infância, o que demanda uma apropriada conceituação para estruturar suas investigações científicas. Dentre os consensos das novas considerações (BHATNAGAR, 2021; KALISCH; MÜLLER; TÜSCHER, 2015; SOUTHWICK et al., 2014), destacamos as visões de que a resiliência: (i) é um processo neurobiológico ativo; (ii) se distingue entre proteção (*resistência*) e recuperação (*resiliência*); (iii) é manifestada como um resultado, um processo ou um traço; (iv) é multidimensional; (v) é essencialmente influenciada pela avaliação individual sobre adversidades.

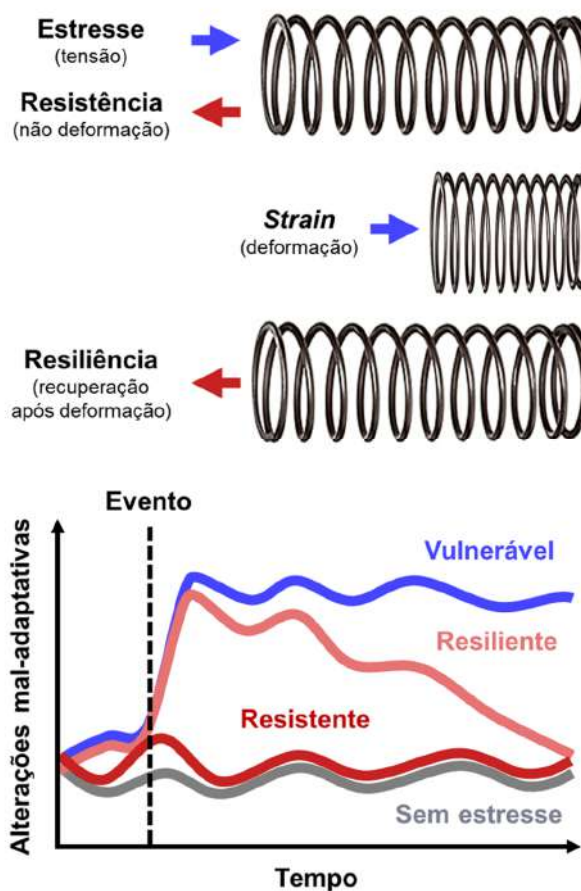
Estresse e diversidade são as bases da evolução. Características que garantiram o adequado enfrentamento ao estresse foram selecionadas. Assim, os processos associados à resiliência são naturais e comuns, i.e., a “regra”, enquanto a vulnerabilidade seria a “exceção” (MASTEN, 2001). Tal consideração condiz com a prevalência de transtornos psiquiátricos relacionados ao estresse próximas de 5% na população mundial (ABBAFATI et al., 2020), mesmo em uma sociedade com crescente presença de estressores psicossociais. A adaptação como o natural é considerado desde o início das concepções sobre a biologia do estresse. Tanto é, que Hans Selye nomeou originalmente o processo como “síndrome da *adaptação* generalizada” (SELYE, 1936). Neste sentido, McEwen et al. (2015) enfatizam o entendimento do “bom” estresse para o desenvolvimento de resiliência na clínica. A relevância da compreensão da resiliência como um processo natural é de que grande parte dos estudos experimentais focaram em reverter estados psicopatológicos por tratamentos farmacológicos ou de estimulação, que seriam uma aproximação “artificial” a processos biológicos naturais, que ainda são pouco compreendidos.

A distinção entre aspectos adaptativos e mal-adaptativos não é meramente tautológica. Usualmente, modelos experimentais modelam o trauma (derrota social, choques inescapáveis, estresse imprevisível, aprendizado de medo, conflito ameaça-recompensa) e não a adaptação (dominação social, choques escapáveis, estresse previsível, aprendizado de segurança, discriminação entre aversão e recompensa). Deste modo, a pouca distinção dos aspectos adaptativos em modelos experimentais de condições clínicas pode ter escondido mecanismos neurais associados à resiliência ou tê-los mal interpretado como associados à vulnerabilidade (ver seção

1.4.3.). Portanto, é importante que experimentos interessados nas bases neurais do enfrentamento ao estresse realizem uma clara delimitação – na programação experimental, dos indivíduos ou dos comportamentos – dos aspectos adaptativos e mal-adaptativos para uma boa definição de seus correlatos neurais.

O termo resiliência vem do latim *resilire* que significa “pular de volta” (*re*: volta, *salire*: pular) (MERRIAM-WEBSTER, [s.d.]). De acordo, na física de materiais é compreendida como o processo de recuperação de uma deformação, ou, aplicando a analogia ao contexto psicológico, à recuperação de um trauma. No entanto, trabalhos pioneiros na psicologia da resiliência investigaram características de indivíduos que cresceram em populações vulneráveis (GARMEZY; STREITMAN, 1974; WERNER; BIERMAN; FRENCH, 1971; WERNER; SMITH, 1982), mas que prosperaram na vida adulta, ou seja, enfatizando os fatores protetores. A APA define resiliência como o processo de adaptação diante de adversidade, traumas, tragédias, ameaças ou mesmo fontes significativas de estresse (APA, [s.d.]). Esta definição ampla não considera as particularidades de suas facetas (SOUTHWICK et al., 2014), como a distinção entre resistência (proteção) vs. resiliência (recuperação) (Fig. 4), a qual traz implicações importantes, uma vez que podem ter mecanismos neurais distintos (BHATNAGAR, 2021). O foco na recuperação tem maior apelo clínico pela correspondência aos tratamentos de indivíduos já afetados. Mas indivíduos resilientes são, necessariamente, resistentes? Em outras palavras, “o que não mata, fortalece”?

Estressores psicossociais precedem com maior



**Figura 4** – Representações gráficas das definições, física e psicobiológica, de resistência e resiliência ao estresse. Modificado de Bhatnagar (2021).

incidência o primeiro episódio de depressão, enquanto episódios subsequentes ocorrem sem a presença de estressores de mesma relevância, indicando um déficit na resistência contra novas adversidades apesar destes indivíduos terem se recuperado dos episódios anteriores (POST, 1992). Portanto, o estudo dos mecanismos da resistência, e não só da recuperação, é importante para o desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes e duradouros.

Indivíduos são resilientes ou suscetíveis? Isto é, resiliência e susceptibilidade se manifestam entre indivíduos para qualquer adversidade, para um tipo particular de adversidades ou para cada adversidade independentemente? Colaborei na elaboração e análise de dados do trabalho de iniciação científica de Benedito de Oliveira-Júnior, onde investigamos perfis comportamentais de ratos expostos, ou não, a choques inescapáveis e submetidos a uma bateria de avaliações comportamentais indicativas de ansiedade, depressão e cognição e, por fim, classificados como resilientes ou suscetíveis em um teste de aprendizado de fuga. Para nossa surpresa, observamos correlações fracas entre comportamentos avaliados em testes diferentes, mas fortes entre os avaliados nos mesmos testes, mesmo que realizados em dias diferentes. Usando análise de agrupamento por *k*-médias identificamos uma diversidade de fenótipos comportamentais multivariados, formando cinco agrupamentos mais robustos, mostrando que os mesmos indivíduos apresentam comportamentos adaptativos e mal-adaptativos em diferentes testes. No entanto, dentre estes, o agrupamento mais específico do grupo de animais estressados consistia em um fenótipo com a maioria dos comportamentos indicativos de vulnerabilidade. De acordo, usando PCA, observamos que a variação coletiva mais explicativa dos dados comportamentais correspondia a fenótipos quase completos de resiliência (performance de fuga, preferência por sacarose, tempo nos braços aberto do labirinto em cruz elevado, baixa atividade no campo aberto). Estes achados mostram que a exposição a choques traumáticos pode gerar alterações comportamentais generalizadas, i.e., *traços*, mas salienta a diversidade individual de formas de enfrentamento a adversidades em diferentes contextos, i.e., *processos* (OLIVEIRA-JÚNIOR, 2019). Em concordância, estudos em humanos também revelam uma diversidade de estratégias de enfrentamento optadas para diferentes adversidades e contextos (FOLKMAN; LAZARUS, 1980). Como implicação mais

relevante, estes estudos encorajam a investigação neurobiológica de diferentes dimensões comportamentais separadamente.

Por fim, muitos autores reconhecem que estratégias adaptativas ou mal-adaptativas são determinadas pela forma como o indivíduo avalia a adversidade cognitivamente. Em convergência com as demais considerações anteriores, quais seriam, então, as dimensões de avaliação sobre adversidades que determinam processos ou traços comportamentais de enfrentamento adaptativo ou mal-adaptativo ao estresse?

### **1.3. Dimensões psicobiológicas do enfrentamento ao estresse**

Estresse sempre foi um conceito de difícil definição. As descrições iniciais de Hans Selye mostrando que diversos agentes nocivos causavam uma síndrome de modificações histológicas em comum (SELYE, 1936), posteriormente denominada *estresse*, levou à hipótese de um fator único que causaria tal resposta. Nesta perspectiva, Selye e apoiadores consideravam que este fator único seria algum mecanismo físico, biológico, sendo mediadores hormonais os principais candidatos (SELYE, 1975). Em contrapartida, John W. Mason enfatizou que uma melhor compreensão poderia se dar pela adição da dimensão psicológica e que o tal fator único do estresse poderia ser, na verdade, emocional (MASON, 1975). A grosso modo, o estresse ocorreria se houvesse a percepção subjetiva do estresse, o que justificaria a dificuldade das definições biológicas. Na época, a presença de úlceras gástricas era o marcador mais bem estabelecido de efeitos patológicos do estresse. Jay M. Weiss realizou uma série de experimentos mostrando que ratos expostos a choques inescapáveis desenvolviam mais úlceras do que animais que podiam escapar ou que não recebiam choques (WEISS, 1968). Em outro estudo, mostrou que a sinalização dos estímulos aversivos diminuía o tamanho das úlceras, comparadas com as de animais expostos a estressores imprevisíveis, e que o tamanho das ulcerações se correlacionava com a duração dos estímulos sinalizadores (WEISS, 1971), indicando que tanto a capacidade de enfrentamento quanto a cronicidade da antecipação de estressores, i.e., fatores “psicológicos”, influenciavam de forma crítica a origem dos marcadores patológicos do estresse (WEISS, 1972). Desde então, a pesquisa na neurobiologia do estresse mostrou uma predominância nos fatores hormonais, mas também reconheceu a relevância das causas e consequências

psicológicas do estresse devido ao envolvimento em transtornos de humor, ansiedade e de estresse pós-traumático (MCEWEN, 2019).

Novas revisitações sobre o conceito de estresse têm consensualmente incluído o aspecto da percepção cognitiva (KOOLHAAS et al., 2011; LAZARUS, 1993; LEVINE; URSIN, 1991). Mas quais seriam as qualidades psicológicas associadas a uma experiência de estresse que determinam adaptação ou doença? O trabalho seminal *Stress, appraisal and coping* de Folkman e Lazarus (1984) propõe o modelo transacional<sup>4</sup> de enfrentamento ao estresse. Neste, o indivíduo faz a *avaliação* de um evento como sendo inócuo ou uma ameaça (potencial dano), um dano (dano já ocorrido) ou um desafio (potencial recompensa). Então, o indivíduo avalia se possui, ou não, os recursos para enfrentar a situação. Os esforços empreendidos para terminar o evento são definidos como *enfrentamento* e as formas comportamentais e cognitivas optadas para tal são definidas como as *estratégias*. Então, as consequências do enfrentamento podem levar à *reavaliação* dos eventos e estratégias. Análises fatoriais apontam duas classes de enfrentamento denominadas enfrentamento focado no problema, relacionado a comportamentos ativos direcionados à eliminação da origem do estresse, e enfrentamento focado na emoção, relacionado a comportamentos passivos com objetivo de reduzir ou evitar as emoções negativas causadas pelo estresse (FOLKMAN et al., 1986; FOLKMAN; LAZARUS, 1980).

Paralelamente, notamos que outros modelos sobre enfrentamento ao estresse e experiência emocional apresentam dimensões similares: Wilhelm Wundt, considerado pai da psicologia científica moderna, descreve, em 1897, a experiência emocional a partir de três dimensões: prazeroso vs. desagradável, excitação vs. depressão, tensão vs. relaxamento (WUNDT, 1980); O modelo circumplexo de Russell e Barrett considera as duas dimensões: ativação e valência (RUSSELL; BARRETT, 1999); O modelo de vetor descreve ativação e valência como dimensões dependentes (BRADLEY et al., 1992); O modelo PANA diferencia a ativação positiva e ativação negativa como dimensões independentes (WATSON; TELLEGEN, 1986); O modelo PAD descreve três dimensões: prazeroso vs. desagradável, ativação vs. não-ativação e dominância vs. submissão (MEHRABIAN, 1980); O casal Blanchard (BLANCHARD; BLANCHARD, 1990) descreve a influência da avaliação da intensidade, distância e

---

<sup>4</sup> Centrado nas transações, ou interações, entre sujeito e ambiente.

se uma ameaça é escapável vs. inescapável sobre respostas de defesa; McNaughton e Corr (MCNAUGHTON; CORR, 2004) propõe a relevância da direção, i.e., aproximação vs. esquiva, em relação a um perigo, e se este é evitável vs. inevitável; O senso de coerência do sociólogo Aaron Antonovsky sobre a relação entre função mental saudável e estresse descreve os três componentes: compreensibilidade (crença de que eventos ocorrem de forma previsível), gerenciabilidade (crença de que possui recursos para controlar eventos) e significância (crença de que eventos têm um propósito) (ANTONOVSKY, 1979). A partir da síntese destas propostas, as dimensões recorrentes, mesmo sob diversidade léxica, se referem às avaliações de um evento como: (i) estresse ou não (i.e., ativação, excitação, intensidade, perigo ou previsibilidade); (ii) de valência positiva (i.e., desafio, prazeroso, positivo, aproximação ou propósito) ou negativa (i.e., ameaça, dano, desagradável ou negativo); (iii) controlável (i.e., escapável, evitável, dominável, gerenciável ou posse de recursos) ou incontrolável (i.e., depressão, inevitável, submissão ou ausência de recursos).

A compreensão de processos psicobiológicos a partir de dimensões compactua com a iniciativa *Research Domain Criteria* (RDoC), institucionalizada pelo NIMH (INSEL et al., 2010). A iniciativa alega que o pouco avanço em tratamentos psiquiátricos nas últimas décadas se deve à dificuldade na translação entre pesquisas neurocientíficas e os diagnósticos clínicos, e, então, propõe *domínios* de funcionamento mental transdiagnósticos (valência negativa, valência positiva, cognitivo, social, vigília/sono e sensório-motor) que correspondem a sistemas neurais bem estabelecidos. Assim, a compreensão destas funções/sistemas na pesquisa básica pode ser melhor transferido ao desenvolvimento clínico para condições em que tais domínios estão afetados (CUTHBERT; INSEL, 2013). Um aspecto interessante é o desencorajamento da busca por modelos animais de “depressão” ou de “ansiedade” que objetivam representar as condições clínicas por completo, mas apoiam a delimitação e compreensão de funções específicas associadas a estas desordens (GURURAJAN et al., 2019).

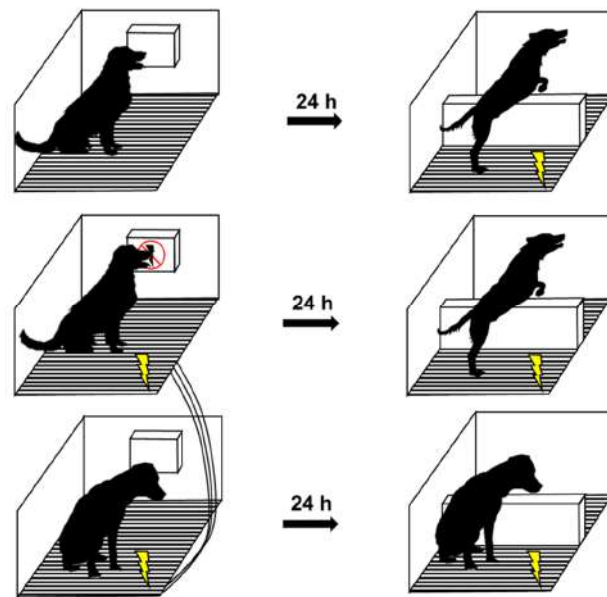
Com base nas propostas teóricas anteriores, na possibilidade de delimitação experimental, na importância da discriminação entre aspectos adaptativos e mal-adaptativos, nas evidências de distinção neurobiológica, na clareza da translação com manifestações clínicas e no encorajamento do ponto de vista de uma psiquiatria científica dimensional transdiagnóstica, propomos uma estrutura para localização

experimental de correlatos neurais de enfrentamento ao estresse baseada em três dimensões<sup>5</sup> fundamentais: *controlabilidade*, *segurança* e *valência* (Fig. 1).

### 1.3.1. Controlabilidade

A controlabilidade se refere à expectativa de que um estressor é controlável ou incontrolável. A influência da controlabilidade sobre estímulos aversivos foi demonstrada pela primeira vez por Martin E. Seligman e Steven F. Maier no trabalho seminal, *Failure to escape traumatic shock* (SELIGMAN; MAIER, 1967). Nele, os autores implementaram o desenho triádico (Fig. 5), onde um grupo de cães podia finalizar choques nas patas pelo pressionamento de um painel, enquanto outro grupo consistia em sujeitos pareados, que recebiam choques de mesmas intensidades e durações do primeiro grupo, mas de forma inescapável e, por fim, um terceiro grupo de animais não expostos a choques. No segundo dia, os três grupos eram submetidos a um teste de fuga onde poderiam escapar de choques saltando sobre um muro entre compartimentos. Os autores observaram que os animais previamente expostos a choques escapáveis e os não

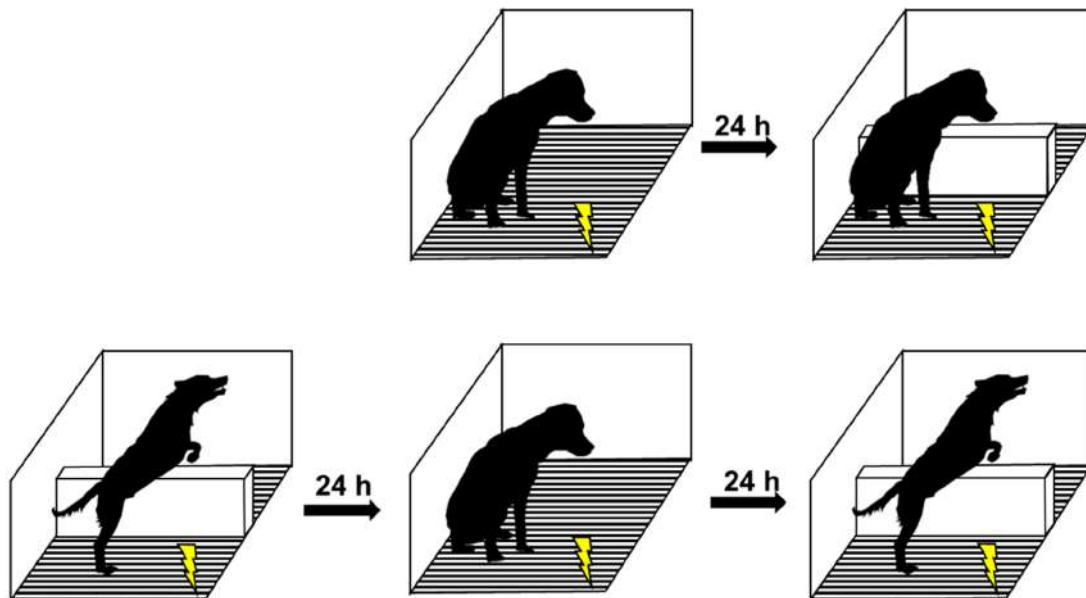
expostos aprendiam a nova tarefa facilmente, porém os animais expostos a choques incontroláveis não realizavam as respostas, ou, mesmo quando realizavam algumas vezes, falhavam em aprender a tarefa. Esta falha no aprendizado foi chamada de *desamparo aprendido*. Em um segundo experimento, descrito na mesma publicação, um grupo de animais foi exposto a choques escapáveis enquanto outro grupo não foi exposto. Então, no segundo



**Figura 5** – Representação gráfica do modelo triádico usado em Seligman e Maier (1967) e do fenômeno do desamparo aprendido. Extraído de Marques (2016).

<sup>5</sup> O presente modelo especifica as dimensões relacionadas ao enfrentamento adaptativo ou mal-adaptativo ao estresse, mas não desconsidera outras qualidades do estresse que influenciam comportamentos e bases neurais como: repertório inato ou aprendido; estímulo social ou não-social; modalidade homotípica ou heterotípica; ameaça distante ou próxima; exposição aguda ou crônica; intensidade moderada ou severa; aversão certa ou incerta.

dia, submeteram os animais a choques incontroláveis e realizaram a tarefa de fuga no terceiro dia. Neste segundo experimento, observaram que animais não expostos a choques no primeiro dia eram suscetíveis à indução de desamparo aprendido, enquanto os animais previamente expostos a choques escapáveis não o desenvolviam, como se tivessem se tornado resistentes (Fig. 6). Este fenômeno foi originalmente denominado *imunização comportamental* e posteriormente chamado de resistência aprendida.



**Figura 6** – Representação gráfica do experimento de Maier e Seligman (1967) que demonstrou o fenômeno da imunização comportamental. Extraído de Marques (2016).

Em pouco tempo depois, a hipótese explicativa do desamparo aprendido foi elaborada como uma hipótese etiológica da depressão clínica que propõe que a generalização da falta de controle sobre eventos negativos como um elemento determinante do desenvolvimento da condição (ABRAMSON; SELIGMAN; TEASDALE, 1978; SELIGMAN, 1975). O controle sobre estressores se associa a funções executivas, controle cognitivo, enfrentamento focado no problema, estilo de enfrentamento ativo, autoeficácia, otimismo e viés otimista, *locus* de controle interno, autonomia, responsabilidade, fé, liderança, suporte social e exercício físico. Enquanto isso, a falta de controle é associada a aspectos mal-adaptativos, como culpabilidade, baixa autoestima, pessimismo, subordinação social, despersonalização, entre outros.



Experimentalmente, controle é a dependência entre ações comportamentais e consequências ambientais, enquanto a falta de controle é a independência (MAIER; SELIGMAN, 1976). A expectativa de controle é manifestada pelo aprendizado e realização das ações comportamentais que terminam estressores, enquanto da falta de controle é pela falha ou lentidão destas respostas (desamparo). Uma forma mais enfática de demonstrar estas expectativas é pela avaliação das respostas após mudar a controlabilidade na programação experimental, isto é, avaliar se animais expostos a choques controláveis tentam escapar de choques incontroláveis ou se animais expostos a choques incontroláveis falham em escapar de choques controláveis no futuro. O método mais indicado para delinear efeitos da controlabilidade é o modelo triádico, usualmente aplicando choques escapáveis (ES, *escapable shocks*) em um grupo, inescapáveis pareados (IS, *inescapable shocks*) em outro e outro que não recebe choques (NS, *no shocks*). Utilizando este modelo em ratos, foi observada uma constelação de efeitos diferenciais que ocorrem por IS, mas não por ES, abrangendo aumento de ansiedade, medo aprendido, apatia e subordinação social, sensibilidade a drogas de abuso, úlceras, crescimento de tumores, déficits cognitivos e prejuízo acentuado de plasticidade neural (MAIER; WATKINS, 1998; MARQUES, 2016; SHORS et al., 1989; SKLAR; ANISMAN, 1979; WEISS, 1968). Além disso, a exposição a ES ou IS não influencia a liberação de glicocorticoides (MAIER et al., 1986), que é elevada em ambas as condições, e efeitos diferenciais na plasticidade hipocampal ocorrem mesmo em animais adrenalectomizados (SHORS et al., 1990), indicando que estes efeitos diferenciais não podem ser explicados por efeitos hormonais.

Mesmo que o modelo triádico seja elegante e bem estabelecido, consideramos que a identificação de correlatos neurais de controlabilidade sobre estressores seria mais precisa em um modelo animal que conseguisse discriminar graus de controle sobre estímulos aversivos em um mesmo sujeito. Então, supervisionei o projeto de iniciação científica de Bruno de Avó Mesquita com o objetivo de caracterizar a capacidade de discriminação de graus de controle sobre estímulos aversivos em respostas inatas (correr e saltar) e aprendidas (focinhar) em ratos. Para isso, aprendemos noções básicas de eletrônica e programação em Arduino e construímos um aparato modular para a tarefa de focinhar. Então, investigamos a capacidade de discriminação entre ES e IS sinalizados diferentemente (som ou luz) apresentados de

forma intercalada. Utilizando análise de agrupamento, descobrimos que a grande maioria dos animais generalizava suas respostas para controle (latências rápidas de fuga para ambos estímulos) ou falta de controle (latências longas ou ausência de respostas), porém alguns animais, em diferentes coortes e linhagens testadas, apresentaram discriminação significativa<sup>6</sup>, fugindo rapidamente para estímulos controláveis e lentamente para incontroláveis (MESQUITA, 2020). Este estudo confirma a dificuldade de um paradigma experimental objetivando a discriminação entre estressores controláveis e incontroláveis, corroborando a hipótese de que expectativas de controle ou falta de controle tendem a ser generalizadas em indivíduos, fenômeno que também ocorre em humanos (ABRAMSON; SELIGMAN; TEASDALE, 1978; MAIER; SELIGMAN, 1976; ROTTER, 1966; SHAROT, 2011). Tomados em conjunto, estes achados indicam que a dimensão da controlabilidade está principalmente relacionada a formação de *traços* de enfrentamento ao estresse. Portanto, a melhor forma de identificar correlatos neurais da controlabilidade seria pela investigação das atividades durante ES e IS que predizem indivíduos resistentes ou desamparados. Este desenho experimental foi utilizado no Artigo I.

Nos anos 80 e 90, Maier e colaboradores investigaram as bases neurais da falta de controle sobre o estresse. Em suma, seus estudos mostraram que após a exposição a IS ocorria o aumento da liberação de serotonina dos núcleos da rafe, especialmente, do núcleo dorsal da rafe, e que os efeitos da atividade serotoninérgica em várias estruturas – incluindo formação amigdal (AMG), estriado dorsomedial, núcleo accumbens (NAc), substância cinzenta periaquedutal e hipocampo ventral (VH) – mediavam os componentes comportamentais da síndrome do desamparo. Apenas décadas depois, o mesmo grupo descobriu que a inibição farmacológica do PFC, na região prélimbica (PL), bloqueava os efeitos protetores do controle sobre o estresse, fazendo com que animais expostos a ES apresentassem aumento da liberação de serotonina, comportamento de desamparo e várias outras das consequências negativas associadas previamente apenas a IS (revisado em MARQUES, 2016). Sob a luz dos achados da neurociência obtidos nos 50 anos desde a hipótese original do desamparo aprendido, Maier e Seligman propuseram sua

---

<sup>6</sup> A discriminação entre graus de controle sobre eventos aversivos em um modelo experimental foi uma descoberta inédita. Embora expectativas de controle sejam mais associadas à resiliência, a importância da diferenciação entre controle e falta de controle é um importante fator discutido na literatura clínica na promoção de aceitação e adesão a tratamentos, especialmente de transtornos relacionados a abuso de substância (SOUTHWICK et al., 2015).

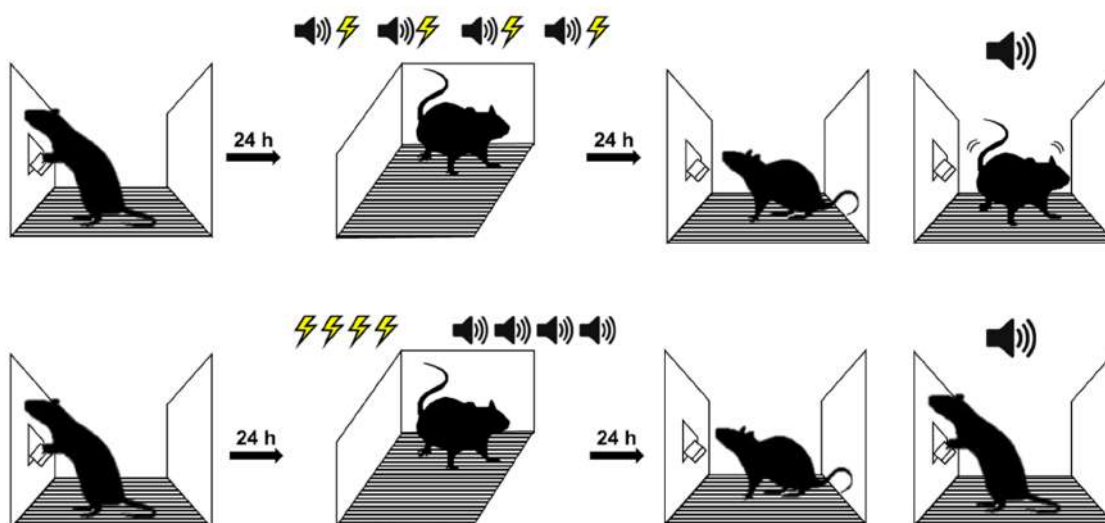
revisão. Enquanto a hipótese original postulava que a *falta de controle* seria a variável aprendida que determinaria as consequências no organismo, os achados neurais mostraram que, na verdade, é o *controle* a informação codificada ao nível cortical superior e que os efeitos do estresse incontrolável são os efeitos do estresse por si quando a detecção de controle é ausente (MAIER; SELIGMAN, 2016). Apesar de grande parte dos estudos apontarem para o PL como forte candidato à base neural da codificação do controle, Christianson e colaboradores, recentemente mostraram que a ativação neuronal, por expressão de c-Fos, em múltiplas regiões amplamente distribuídas diferenciam animais expostos a ES e IS, sugerindo um processamento em rede mais complexo (WORLEY et al., 2020). No entanto, como o PFC, especificamente, e como redes de larga escala processam o controle sobre o estresse é ainda desconhecido.

### 1.3.2. Segurança

A segurança se refere à avaliação da presença ou ausência de um estresse. Se atribui a Winston Churchill a analogia de que a depressão é um cão negro que, notável ou não, sempre acompanha seu dono, metáfora a qual foi utilizada pela Organização Mundial da Saúde para conscientização sobre a condição (WHO, 2013). Outra comparação, feita pelo escritor Andrew Solomon, é de que a depressão é um demônio do meio dia, ou seja, não necessariamente ligado à escuridão, mas ao cotidiano (SOLOMON, 2014). O aspecto central destas analogias remete aos relatos de pacientes com depressão que apresentam pensamentos ou sentimentos negativos de modo persistente, difíceis de serem suprimidos voluntariamente. A relevância da espontaneidade de pensamentos automáticos negativos foi formulada pelo psicólogo Aaron T. Beck e o desenvolvimento de estratégias cognitivas para supressão de tais estados mentais fundou a base da terapia cognitivo-comportamental, que hoje é a psicoterapia padrão ouro para depressão (BECK; ALFORD, 2009). A capacidade de diferenciar segurança de medo tem relações gerais com regulação emocional, redução de estresse, alívio de sintomas, enfrentamento focado na emoção, previsibilidade e reavaliação cognitiva, enquanto a generalização de medo ou incapacidade de regulação do estresse podem ser associadas a ansiedade, neuroticismo, revisitação de traumas e ruminação.

Em um dos experimentos de padronização para meu doutorado, apresentamos a um rato um estímulo luminoso que precedia ES e um tom, apresentado nos intervalos, o qual pretendíamos que fosse “neutro” para comparação das atividades neurais. No entanto, observamos que, enquanto a luz intensificava respostas de congelamento, tentativas de esquiva, avaliação de risco, o estímulo “neutro” exercia o efeito oposto, suprimindo respostas de medo, iniciando comportamentos de autolimpeza e sonolência, porém, os comportamentos de medo retornavam rapidamente quando este segundo estímulo era cessado. Este resultado intrigante, indicou que este estímulo não era exatamente “neutro”, mas, na verdade, associado à segurança. Alguns anos antes dos experimentos clássicos do desamparo aprendido, outro estudo influente foi realizado na Universidade de Pensilvânia, conduzido pelo psicólogo Robert A. Rescorla, que estendeu os trabalhos prévios de Ivan Pavlov sobre condicionamento clássico para respostas de medo. Em uma série de experimentos, Rescorla e colaboradores mostraram que a associação entre um estímulo condicionado (CS, *conditioned stimulus*) e um estímulo não-condicionado (US, *unconditioned stimulus*) se dá pela probabilidade do CS predizer o US (RESCORLA; WAGNER, 1972). Neste sentido, um CS com uma correlação positiva ao US aversivo passava a aumentar respostas antecipatórias de medo, como esquivas e supressão de pressionamento em barras para obtenção de comida, formando, portanto, um condicionamento excitatório. No entanto, o CS apresentado com correlações negativas ao US, passava a inibir as respostas de medo, estabelecendo, assim, um condicionamento inibitório (RESCORLA, 1969a, 1969b; RESCORLA; LOLORDO, 1965) (Fig. 7). Rescorla, então, descreveu duas propriedades que definem um inibidor condicionado: a *somação*, que ocorre se a apresentação do CS inibitório, adicionado a um contexto ou a um estímulo que evocam respostas de medo, consegue suprimir tais respostas; o *retardamento*, em que um CS aprendido como inibitório é mais dificilmente associado a medo posteriormente (RESCORLA, 1971). Inibidores condicionados de medo são atualmente denominados *sinais de segurança*.

O condicionamento excitatório de medo, ou medo condicionado, é um dos desenhos experimentais mais extensivamente investigados na neurociência para a compreensão dos processos de detecção, expressão, aquisição, consolidação, evocação e extinção de memórias aversivas, o qual tem relevância especial para o entendimento do transtorno de estresse pós-traumático (CAREAGA; GIRARDI;



**Figura 7** – Representação gráfica de um dos experimentos de Rescorla (1969a) que descreveram o condicionamento excitatório (acima) e o condicionamento inibitório (abaixo) de medo por diferentes contingências entre CS (tom) e US (choque).

SUCHECKI, 2016). Mesmo sob constantes complementações, o circuito neural envolvido nas respostas de medo é bem estabelecido. De forma geral, este envolve projeções sensoriais, associativas e modulatórias para a AMG, a qual envia projeções para subáreas da substância cinzenta periaquedutal e hipotálamo, evocando as respostas motoras de congelamento, hormonais e autonômicas associadas ao medo (LEDOUX, 2000). Apesar do congelamento ter sido o comportamento mais investigado, recentemente houve um ressurgimento do interesse nos comportamentos ativos, como a esquiva ativa (LEDOUX et al., 2017). Nestes comportamentos, evidências também indicam a participação fundamental da AMG e incluem sua interação com o NAc (CAMPESE et al., 2016; LEDOUX; GORMAN, 2001). Os estudos de mecanismos neurais associados à segurança focaram majoritariamente no processo de extinção (MILAD; QUIRK, 2012). Estes estudos mostram que no processo de extinção não ocorre meramente a habituação passiva da atividade da AMG, mas o engajamento de circuitos corticais que a inibem. Neste sentido, o processo de extinção foi interpretado não como o “esquecimento do medo”, mas como a formação de uma nova “memória de extinção” (MILAD; QUIRK, 2002; QUIRK; MUELLER, 2007). A área infralímbica (IL) do PFC é a mais bem estabelecida em mediar extinção de medo em roedores (SIERRA-MERCADO; PADILLA-COREANO; QUIRK, 2011) e seu provável homólogo humano é o córtex cingulado subgenual, que

é o principal alvo de estimulação cerebral profunda para depressão (MAYBERG et al., 2005). Estudos usando desenhos experimentais de discriminação de medo ou de sinais de segurança por retroalimentação (i.e., sinalizam o fim de estressores) também apontam para a inibição cortical da AMG como um marcador neural generalizado da supressão de medo em diferentes situações de segurança (CHRISTIANSON et al., 2011; FOILB et al., 2021). O modelo de inibição corticolímbica compreende a maior parte dos achados. No entanto, há evidências de que o PFC, em especial, a área PL, participa da expressão de medo (BURGOS-ROBLES; VIDAL-GONZALEZ; QUIRK, 2009; SIERRA-MERCADO; PADILLA-COREANO; QUIRK, 2011; SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010), de que na codificação de segurança há modificações celulares, morfológicas e eletrofisiológicas locais na AMG (GENUD-GABAI; KLA VIR; PAZ, 2013; OSTROFF et al., 2010; SANGHA; CHADICK; JANAK, 2013; STUJENSKE et al., 2014) e de que diferentes circuitos da interação PFC-AMG são engajados em situações de medo e segurança (HERRY et al., 2008; LIKHTIK; PAZ, 2015; SENN et al., 2014), indicando dinâmicas corticolímbicas mais complexas nestes processos.

Por sua vez, os mecanismos neurais associados ao aprendizado de segurança foram muito menos explorados do que os envolvidos na aquisição e extinção de memórias aversivas (CHRISTIANSON et al., 2012; KONG et al., 2014), porém, este fenômeno é interessante por manifestar um mecanismo mais resistente de supressão do medo. A partir dos estudos de Rescorla, uma das formas mais eficazes de promover o aprendizado de segurança é pela apresentação agrupada, por exemplo, 4 vezes, do CS separadamente do US (POLLAK; MONJE; LUBEC, 2010). Com base neste desenho, o grupo de Eric R. Kandel mostrou aspectos interessantes do seu processamento neural. Em um primeiro estudo, mostraram que o CS+ (condicionado a medo) evocava potenciais de alta amplitude na AMG, enquanto o CS- (condicionado a segurança) reduzia estes potenciais em comparação com a linha de base e evocava respostas no estriado, região usualmente associada a afeto positivo (ROGAN et al., 2005). Em estudos posteriores do grupo, mostraram que animais submetidos a aprendizado de segurança, diferentemente de animais submetidos ao aprendizado de medo, apresentavam vários comportamentos indicativos de resposta a ansiolíticos (aumento de aproximações no labirinto em cruz elevado e campo aberto) e antidepressivos (aumento de atividade no nado forçado e preferência por sacarose). Além disso, estes animais apresentavam maior expressão de neurotrofinas e

neurogênese hipocampal (POLLAK et al., 2008). O mesmo desenho experimental usado em roedores foi adaptado para um estudo em humanos, que também mostrou, por imageamento por tensor de difusão, uma redução da atividade da AMG e aumento da atividade do PFC durante a apresentação de sinais de segurança (POLLAK et al., 2010), indicando uma conservação dos circuitos neurais associados à supressão do medo.

De longe, a dimensão da segurança foi a mais investigada na neurociência do estresse. Não apenas pela exploração do aprendizado e extinção do medo condicionado, mas por muitos dos mecanismos neurais de resiliência serem definidos pela propriedade de aliviar ou reduzir marcadores fisiológicos e comportamentais do estresse. Porém, uma vez que um estressor é detectado, mais de suas qualidades são determinantes, como a controlabilidade, abordada na seção anterior, e a valência.

### *1.3.3. Valência*

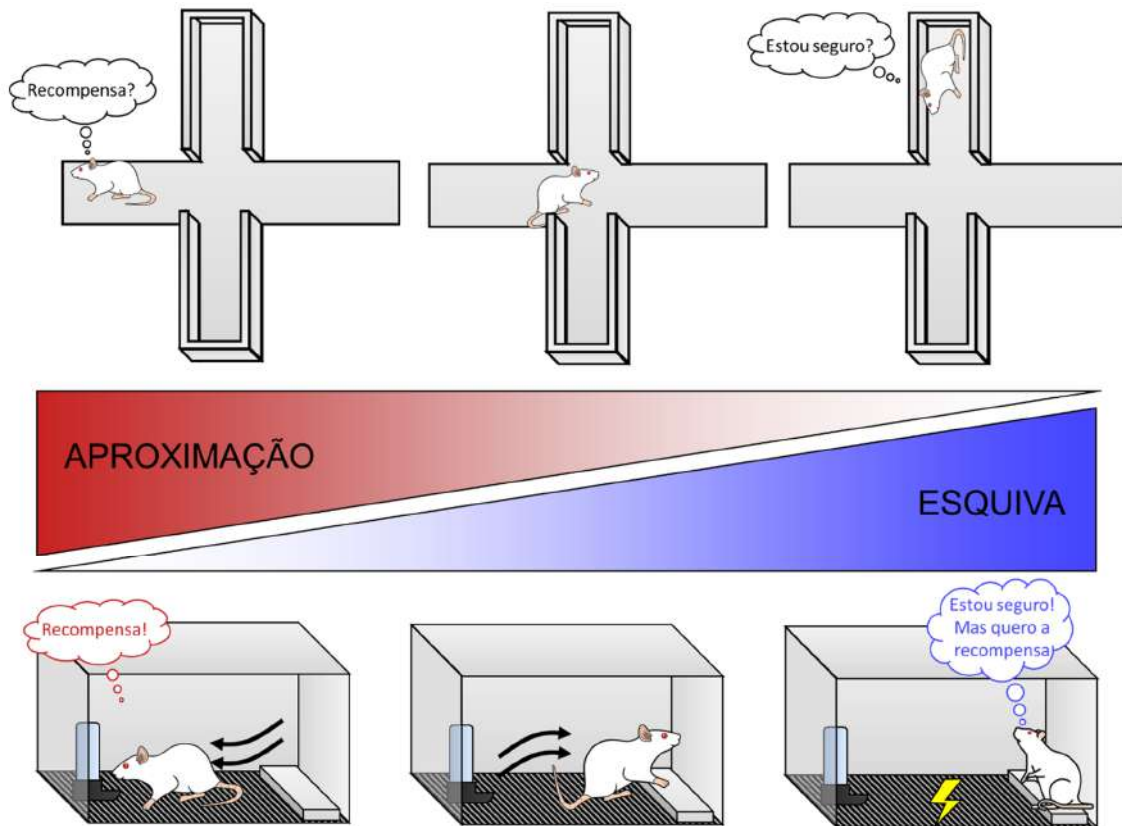
A valência se refere à avaliação de que o enfrentamento a um estressor é direcionado à eliminação do estresse por si (negativa) ou ao ganho de algo adicional (positiva). Estresse muitas vezes é considerado apenas por sua qualidade negativa. KOOLHAAS et al., (2011) revisam os níveis plasmáticos de glicocorticoides – os principais mediadores das repostas fisiológicas ao estresse – em roedores sob diferentes condições e apontam que a situação específica com maior liberação hormonal é quando ratos estão na antecipação de cópula, indicando um importante papel no suporte fisiológico a comportamentos (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000) também de motivação positiva. Um influente argumento a favor da relação entre motivação positiva sobre adversidades e resiliência foi dado pelo psiquiatra austríaco Viktor E. Frankl, que descreve suas experiências no campo de concentração de Auschwitz durante a segunda guerra mundial e aponta que, em face a severos sofrimentos, privações e mortes, indivíduos que mantinham um senso de propósito e significado se recuperaram melhor e apresentaram maior longevidade após o fim da reclusão (FRANKL; SHLUPP; AVELINE, 2021). Apesar das teorias iniciais terem focado nas emoções negativas, foi reconhecido que eventos significativos de estresse também são acompanhados por emoções positivas e que estas são importantes para um enfrentamento adaptativo (FOLKMAN, 1997, 2008). A avaliação de valência positiva sobre um estressor pode ser entendida como a percepção de um “desafio a

ser vencido”, que teria, como consequência, uma possível recompensa ou seria compreendida como uma conquista, gratificação ou um crescimento pessoal. Esta perspectiva é associada à frequência de emoções positivas, gratidão e a encarar situações de dificuldade com bom humor, que são características associadas à resiliência (SOUTHWICK; VYTHILINGAM; CHARNEY, 2005). Por exemplo, estudos recentes descrevem efeitos benéficos e afeto positivo, especificamente em indivíduos com depressão, por memes de internet que fazem piada sobre a condição (AKRAM et al., 2020). Por outro lado, a perda de motivação positiva é um sintoma central na depressão maior (PIZZAGALLI, 2014). De acordo, Andrew Solomon descreve a essência de sua experiência com depressão pelo sentimento de perda de “vitalidade” ao invés de tristeza intensa (SOLOMON, 2014). Ademais, o desequilíbrio pendendo a motivações negativas, que se relaciona a distanciamento, esquiva, apatia e introversão, é um componente elementar na ansiedade (GRAY; MCNAUGHTON, 2000).

Em modelos experimentais, a manifestação comportamental de valências motivacionais durante estresse se dá pela direção do comportamento para áreas associadas à recompensa (*aproximação*) ou à segurança (*esquiva*). Neste contexto, modelos de conflito aproximação-esquiva, ou seja, pela exposição a situações onde estão presentes potenciais recompensas ou ameaças e locais de segurança, têm particular importância (MCNAUGHTON, 2011). Neste sentido, um dos testes mais utilizados é o labirinto em cruz elevado (LCE), o qual conta com motivações inatas de aversão a ambientes iluminados (para os braços fechados) e positiva para exploração (aos braços abertos), bem como o conflito entre ambas devido à incerteza no ambiente desconhecido (WALF; FRYE, 2007) Este teste teve imensa relevância na caracterização de circuitos neurais associados à ansiedade inata (e.g., GRAEFF et al., 1996). No entanto, O grupo de Gregory J. Quirk (DIEHL; BRAVO-RIVERA; QUIRK, 2019) argumenta que uma melhor definição dos locais de segurança, recompensa e ameaça poderiam modelar melhor aspectos comportamentais presentes nas condições clínicas de ansiedade. Então, os autores elaboraram o protocolo de *esquiva mediada por plataforma* (EMP) (BRAVO-RIVERA et al., 2014) (Fig. 8), onde um animal é colocado em uma caixa de Skinner com assoalho capaz de aplicar choques nas patas, uma plataforma que evita choques em um dos cantos e uma barra que entrega recompensas, se pressionada, no outro. Então, o animal passa por condicionamento



de medo e é posteriormente testado se sai da barra para a plataforma quando o CS+ é apresentado. Originalmente, este desenho foi elaborado para investigar bases neurais de comportamentos ativos (esquiva ativa) e passivos (esquiva inibitória, congelamento) de medo. Contudo, a configuração também permite uma clara delimitação da valência motivacional dos comportamentos ativos direcionados à recompensa (positiva) em um ambiente estressor (choques nas patas) ou à plataforma segura (negativa) (DIEHL; BRAVO-RIVERA; QUIRK, 2019).



**Figura 8** – Representação gráfica da comparação entre modelos de conflito aproximação-esquiva baseados em incerteza, como o labirinto em cruz elevado (acima), e aprendido, como a esquiva mediada por plataforma (abaixo). A configuração da esquiva mediada por plataforma condiz com a utilizada no Artigo II e não com o protocolo original que é realizado em uma caixa de Skinner. Figura inspirada em Diehl; Bravo-Rivera; Quirk (2019).

A codificação neuronal de valências emocionais já foi extensivamente estudada (BERRIDGE, 2018). Classicamente, foram estabelecidos sistemas neurais separados de recompensa (ou valência positiva) e de defesa (ou valência negativa) por meio de estudos lesionais, farmacológicos e, principalmente, por estimulação elétrica (HESS W. R.; BRÜGGER, 1943; HUNSPERGER, 1956; OLDS; MILNER, 1954). Inclusive,

sistemas de valência positiva e negativa são considerados como dois domínios separados no RDoC (CUTHBERT; INSEL, 2013). Estes sistemas também são discutidos como sistemas de ativação e de inibição comportamental, respectivamente (GRAY; MCNAUGHTON, 2000). Dentre as regiões mais estudadas no processamento de recompensa, estão a área tegmental ventral (VTA, *ventral tegmental area*) e o NAc, que constituem o sistema mesolímbico (BERRIDGE, 2012), e no processamento de defesas são os circuitos relacionados ao HPC e AMG e seus alvos (CANTERAS; GRAEFF, 2014; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). Além destas, interações de ambos os sistemas com circuitos do PFC são bem estabelecidos. No entanto, um vasto número de evidências tem se acumulado indicando que a codificação de valência é mais complexo do que a delimitação de sistemas separados, mas que muitas das regiões que processam aversão também processam recompensa e vice-versa (BROMBERG-MARTIN; MATSUMOTO; HIKOSAKA, 2010; DEL ARCO; PARK; MOGHADDAM, 2020; KYRIAZI; HEADLEY; PARÉ, 2020; PATON et al., 2006; REIS et al., 2021). De fato, no processamento de valências, populações neuronais podem apresentar seletividade (diferentes neurônios disparam para cada valência), intersecção (neurônios disparam para ambas valências) ou competição (neurônios modulados positivamente em uma valência são inibidos na outra) (HEADLEY et al., 2019; TYE, 2018). Além disso, a definição de quais populações neuronais evocam comportamentos de medo ou apetitivos aparenta depender do contexto. Por exemplo, a estimulação farmacológica de porções do NAc em contextos não-familiares estimulam comportamentos de aversão, enquanto em ambientes familiares induzem comportamentos apetitivos (REYNOLDS; BERRIDGE, 2008). Adotando esta perspectiva mais complexa de que valências podem possuir intersecção ou distinção ao nível neuronal em regiões mesencefálicas, límbicas e corticais, ainda é pouco claro como diferentes valências motivacionais durante o estresse se manifestam ao nível sistêmico, considerando a integração desta rede ampla.

Realizamos alguns experimentos com o intuito de comparar as atividades neurais durante estímulos condicionados à segurança e a medo com as atividades durante estados comportamentais classicamente avaliados em modelos experimentais de ansiedade e depressão. No entanto, nos demos conta de que era difícil demonstrar que os animais realmente haviam adquirido as associações entre o CS e segurança ou medo analisando apenas congelamento. Considerando os

achados na literatura de que sinais de segurança evocam aproximação em ambientes ansiogênicos, hipotetizamos que o CS- evocaria aproximação à recompensa e o CS+, esquivia à plataforma no protocolo de EMP. Além do mais, o teste de EMP poderia ser realizado no próprio aparato de esquivia ativa que nosso grupo havia aprimorando para registro eletrofisiológico há anos. Uma vez que o aparato não possuía um entregador de recompensa, construímos um bebedouro com detecção óptica de presença via emissores-sensores infravermelhos controlados por Arduino que permitia o encaixe de um tubo Falcon com solução para fornecimento de recompensa (ver Fig. 1A do apêndice). Assim, o dispositivo de recompensa era colocado em um canto do aparato e a plataforma no outro, fazendo com que a direção da translocação para um, ou outro, revelasse a valência motivacional do comportamento (Fig. 8). Como memórias aversivas são facilmente aprendidas, consideramos mais adequado realizar, primeiro, o protocolo de aprendizado de segurança e, depois, o aprendizado de medo. Assim, também seria possível testar os critérios de somação e retardo para validar o CS- como sinal de segurança. Por fim, ao mesclar os três protocolos (aprendizado de segurança, aprendizado de medo e EMP) obteríamos um desenho experimental que delinearía bem os estados de medo ou segurança (dimensão: segurança) e aproximação ou esquivia (dimensão: valência) em um único sujeito. Ademais, estipulando que os choques seriam escapáveis diminuiria efeitos adversos da exposição e poderíamos ganhar novas informações sobre o processamento do controle sobre o estresse (dimensão: controlabilidade). Este desenho experimental foi utilizado no Artigo II.

#### **1.4. Oscilações teta e enfrentamento ao estresse: do bem ou do mal?**

Como múltiplas regiões de redes neurais de larga escala atuam de forma integrada em processamentos cognitivos, emocionais e motivacionais envolvidos no enfrentamento ao estresse? As oscilações neurais são um forte candidato a mecanismo capaz de promover a *ligação* funcional entre áreas encefálicas distantes sob tais demandas.

A atividade oscilatória é verificada pelo registro de eletrodos implantados em uma região cerebral e representa o sinal da variação de voltagem extracelular, em relação a um ponto de referência, oriunda da convergência das influências eletromagnéticas das correntes iônicas envolvidas nos processos celulares ocorrendo

no local. Por isso, estes sinais são denominados *potenciais de campo locais* (LFP, *local field potentials*) (BUZSÁKI; ANASTASSIOU; KOCH, 2012). O sinal rítmico dos LFPs contempla oscilações em várias frequências que são delimitadas em bandas linearmente espaçadas em escala logarítmica e são associadas a circuitos osciladores distintos (BUZSÁKI; DRAGUHN, 2004). Notavelmente, oscilações de diferentes regiões podem sincronizar entre si durante demandas funcionais e ambientais. A coerência de oscilações entre regiões, dada pela constância da diferença de fase entre elas, é compreendida como uma medida do engajamento da comunicação entre elas (HARRIS; GORDON, 2015; RUGGIERO et al., 2021; SIGURDSSON; DUVARCI, 2016; VARELA et al., 2001; VOYTEK; KNIGHT, 2015). Neste cenário, é proposto que quando duas regiões sincronizam em uma faixa de frequência, são estabelecidas janelas temporais que permitem que os sinais de entrada cheguem na região alvo em períodos de maior excitabilidade pós-sináptica, aumentando a eficácia da comunicação entre elas (FRIES, 2005, 2015). As diferentes bandas de frequência podem competir, interagir ou participar independentemente em diferentes estados, demandas e desordens. Em relação a aspectos cognitivos, emocionais e motivacionais, as oscilações que mais se destacam são as oscilações teta.

#### 1.4.1. Origem e função: ligando redes neurais

As oscilações teta foram observadas em todas as espécies de mamífero já registradas, inclusive humanos, e representam um dos ritmos biológicos mais estudados deste grupo, principalmente em roedores (BUZSÁKI, 2002). Esta atividade consiste em sinais de alta amplitude, especialmente verificadas na região de *cornu Ammonis 1* (CA1) do hipocampo dorsal (DH, *dorsal hippocampus*), com periodicidade dentro da faixa de 4-12 Hz<sup>7</sup>. Notavelmente, a faixa de frequência das oscilações teta é bem conservada ao longo da evolução, independentemente da variação no tamanho dos cérebros (BUZSÁKI; LOGOTHETIS; SINGER, 2013; M. AGHAJAN et al., 2017), o que sugere um importante papel adaptativo. Os primeiros estudos farmacológicos sugeriram a existência de duas oscilações, o teta “tipo 1” que ocorre em torno de 8 Hz

---

<sup>7</sup> Nota-se variação na literatura quanto à delimitação das frequências de teta. A banda consagrada do EEG humano é 4-8 Hz, no entanto as oscilações teta se manifestam como picos de potência usualmente dentro da faixa de 4-12 Hz em roedores, nos quais há pouca evidência de uma oscilação “alfa” (8-12 Hz), que é marcante em primatas. Além disso, a delimitação fixa das bandas não considera que oscilações biológicas podem percorrer diferentes faixas. Neste sentido, esta delimitação rígida foi comparada à divisão por linhas retas do continente africano pelos colonialistas sem considerar as origens das populações separadas, gerando conflitos (BUZSÁKI, 2006).

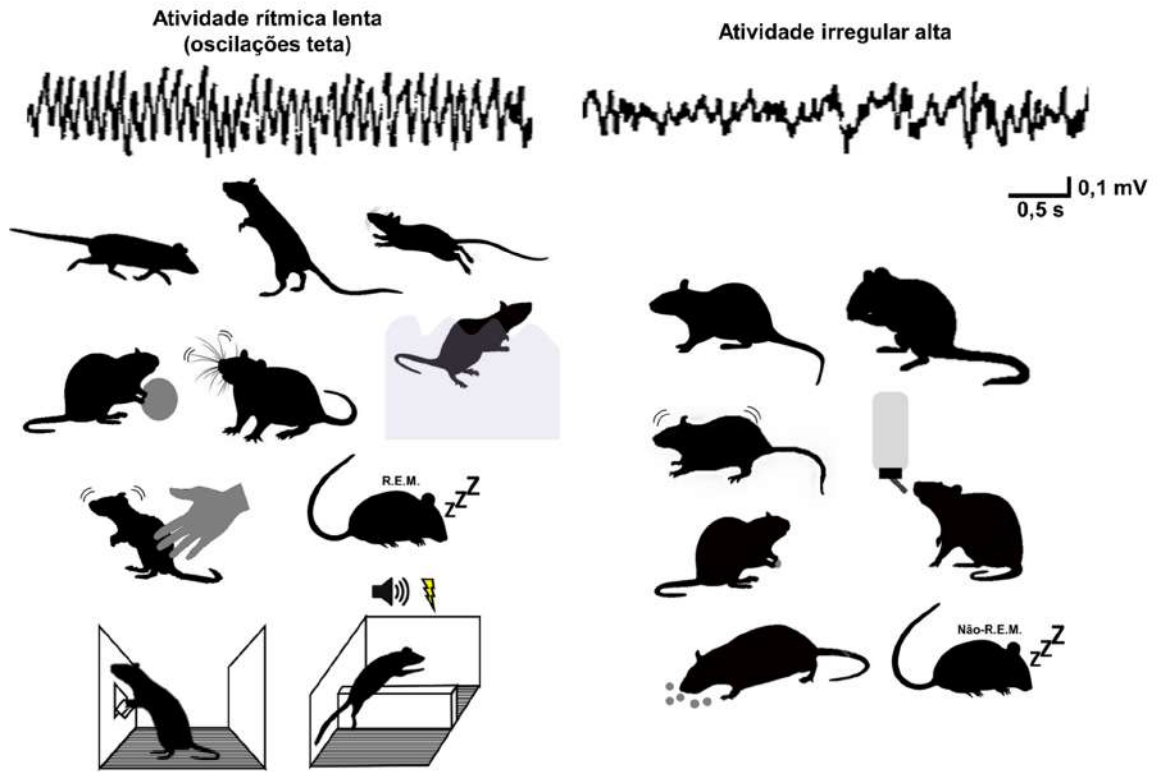
durante locomoção e é abolida durante anestesia, e o teta “tipo 2” que ocorre em torno de 6 Hz no animal imóvel em períodos de vigília acentuada e é abolida por antagonistas colinérgicos, como a atropina (KRAMIS; VANDERWOLF; BLAND, 1975). Mas a atividade teta consiste em uma, duas ou múltiplas oscilações? Olhando para os mecanismos de geração do ritmo, notamos uma multiplicidade de osciladores presentes nos diferentes níveis de organização (encefálico, local, histológico, celular e molecular) que garantem a geração desta atividade (BUZSÁKI, 2002), o que também indica uma importante relevância funcional.

Em um breve sumário (a partir da síntese de elegantes revisões sobre o tema: BRIAN H, 1986; BUZSÁKI, 2002; COLGIN, 2013, 2016; NUÑEZ; BUÑO, 2021; PIGNATELLI; BEYELER; LEINEKUGEL, 2012; VERTES; HOOVER; VIANA DI PRISCO, 2004; VERTES; KOCSIS, 1997), os mecanismos mais bem estabelecidos da origem das oscilações teta na região de CA1 do DH são: (i) Regulação por projeções ascendentes do tronco encefálico, principalmente colinérgicas (ativação e aumento da amplitude) e serotoninérgicas (supressão da amplitude), e do diencéfalo, especialmente da área posterior do hipotálamo, que modula, principalmente, a frequência das oscilações. (ii) Marcapasso pelo septo medial e banda diagonal de Broca, que enviam projeções colinérgicas excitatórias difusas ao HPC mantendo uma excitabilidade tônica e interneurônios parvalbuminérgicos com ritmicidade intrínseca, que projetam, quase que exclusivamente, para interneurônios hipocampais e promovem, assim, periodicidade via desinibição. (iii) Organização das células piramidais, que apresentam longos dendritos apicais, principais recipientes das sinapses excitatórias e inibitórias, e se configuram em colunas paralelas, amplificando sinais elétricos de campo quando flutuações na voltagem ocorrem de modo sincronizado na população. (iv) Projeções glutamatérgicas do córtex entorrinal (EC) pela via perforante para a camada *stratum lacunosum-moleculare*, a camada mais interna que apresenta a maior amplitude da oscilação, e projeções de CA3 pelas colaterais de Schaffer para a camada *stratum radiatum*, a camada mais próxima dos corpos celulares das células piramidais. As duas projeções geram dois dipolos elétricos de fonte-sorvedouro ao longo das camadas, o que explica as diferenças de fase que ocorrem entre elas. Tanto o EC quanto CA3 apresentam teta intrínseco, que em CA3 é associado a projeções recorrentes. (v) Redes intrahipocampais, evidenciadas pela presença de oscilações teta em preparação *in vitro* do HPC isolado,

mesmo após lesões em EC e CA3. O teta intrahipocampal é associado a redes de interneurônios, especialmente por células em cesto e células *oriens-lacunosum moleculare* (O-LM) que formam circuitos recorrentes com as células piramidais. (vi) Propriedades celulares, em que se destacam a ressonância do potencial da membrana na frequência teta, que é observável após estimulações, devido principalmente a correntes de cálcio e a expressão de canais iônicos ativados por hiperpolarização, que permitem o fluxo de corrente marcapasso, gerando ritmicidade intrínseca.

Para além da geração no circuito septohipocampal, as oscilações teta podem sincronizar entre regiões distantes durante demandas (ADEY; DUNLOP; HENDRIX, 1960; KARAKAŞ, 2020). Porém, os mecanismos que modulam esta sincronia e seu significado funcional são menos compreendidos. Muitas regiões, distribuídas pelo encéfalo todo, apresentam atividade local rítmica em teta, mesmo não recebendo projeções diretas do HPC. Estas propriedades sugerem a constituição de uma *rede teta* que pode se integrar pela sincronia destas oscilações (KARAKAŞ, 2020). Não surpreendentemente, grande parte das regiões discutidas previamente (seção 1.3.) apresentam atividade local em teta, indicando a possível participação nesta rede funcional (KIM; WOOD; MOGHADDAM, 2012; PARÉ; COLLINS, 2000; ROYER et al., 2010; SIAPAS; LUBENOV; WILSON, 2005; VAN DER MEER; REDISH, 2011). Dentre estas, uma das interações oscilatórias mais estudadas ocorre entre o HPC e o PFC. Antes de nossos achados referentes ao aumento da sincronia HPC-PFC durante estresse controlável, nosso grupo investigara a modulação colinérgica da plasticidade sináptica e do acoplamento funcional desta via. Estes novos achados nos motivaram a realizar uma revisão detalhada da modulação da plasticidade sináptica e da sincronia oscilatória da rede HPC-PFC, a qual foi conduzida pelo Dr. Rafael N. Ruggiero e recentemente publicada. Um grande destaque deste estudo, foi a observação de que muitos fatores têm influência qualitativamente similar sobre a plasticidade sináptica e a sincronia em teta, modulando ambas positivamente (e.g., acetilcolina, dopamina em níveis ótimos, antidepressivos e performances cognitivas) ou negativamente (e.g., endocanabinóides, serotonina, estresse agudo e crônico) (RUGGIERO et al., 2021). Estas convergências argumentam a favor da relevância da sincronia oscilatória, particularmente nas frequências teta, como uma importante medida de conectividade funcional.

A característica mais extraordinária das oscilações teta é a clara correspondência a estados comportamentais, e a busca pelos seus correlatos comportamentais mais precisos gerou um corpo rico de investigação e debate. As oscilações teta foram inicialmente relatadas em um trabalho alemão que descrevia um método de registro subcortical (JUNG; KORNMÜLLER, 1938). Apenas anos depois, Green e Arduini (1954) realizaram o primeiro estudo compreensivo mostrando que esta atividade em coelhos, e em outras espécies, era particularmente presente em estados de *arousal*, o que era intrigante porque ocorria uma diminuição das amplitudes dos LFPs no resto do encéfalo. Estes achados ganharam notoriedade pois *arousal* era o assunto mais popular da neurociência na época. Grastyán et al. (1959) realizaram os primeiros estudos mostrando que atividade teta hipocampal em gatos aparecia por estímulos salientes, no processo de condicionamento a estímulos aversivos e apetitivos e era particularmente presente quando o animal se orientava em relação aos estímulos. Porém, dentre as propostas iniciais, a mais influente foi feita por Cornelius Vanderwolf, que registrou a atividade em ratos durante uma diversidade de comportamentos. O autor notou que a atividade precedia ou era presente quando o animal andava, explorava, se levantava, cheirava objetos novos, corria, pulava, fugia, nadava, se debatia quando segurado, pressionava barras e era mais forte em movimentos que exigiam esforço, porém, não era aparente durante comportamentos estereotipados, como autolimpeza, imobilidade e consumo de comidas ou bebidas (Fig. 9). Em conclusão, o autor propôs que a atividade ocorria durante *movimento voluntário* (VANDERWOLF, 1969; WHISHAW; VANDERWOLF, 1973). Ao longo dos anos, várias funções comportamentais das oscilações teta foram apresentadas, porém as propostas mais influentes foram: Vigília (GREEN; ARDUINI, 1954); Orientação, preparação e motivação (GRASTYÁN et al., 1959, 1965); Movimento voluntário (VANDERWOLF, 1969); Integração sensório-motora, programação e seleção de ação; Inibição sensorial (SAINSBURY, 1998), regulação *top-down* e *bottom-up* (LIKHTIK; PAZ, 2015); Ansiedade e inibição comportamental (GRAY; MCNAUGHTON, 2000); Aprendizado, memória e plasticidade sináptica (HERWEG; SOLOMON; KAHANA, 2020; KAHANA; SEELIG; MADSEN, 2001); Navegação (BUZSÁKI, 2005); Controle cognitivo, atenção e memória de trabalho (CAVANAGH; FRANK, 2014). Atualmente, de modo geral, novos estudos



**Figura 9** – Representação gráfica dos correlatos comportamentais do ritmo teta hipocampal (esquerda) observados por Vanderwolf (1969). Traços representativos do LFP do HPC extraídos da mesma publicação durante rato se debatendo (esquerda) e imobilidade (direita).

comportamentais envolvendo teta se agrupam nas classes *cognição-translocação* e *emoção-ansiedade* (KOROTKOVA et al., 2018).

#### 1.4.2. Funções cognitivas e sensório-motoras

No âmbito cognitivo, se destacam os estudos de codificação espacial. Este cenário é marcado pelo trabalho seminal de O'Keefe e Recce (1993), mostrando que disparos de células de lugar no HPC são acoplados a fases das oscilações teta, de modo que mudam progressivamente de fase conforme o animal entra e sai de um campo espacial. Este fenômeno ficou conhecido como precessão de fase e demonstra que as oscilações representam uma sintaxe para codificação neuronal, organizando a atividade de assembleias em sequências temporais (BUZSÁKI, 2002). Estudos mais recentes mostram que estas mesmas propriedades de codificação não ocorrem apenas para processamento espacial, mas como uma forma de indexação para diferentes modalidades de informação (BUZSÁKI; TINGLEY, 2018). Em adição a esta perspectiva, é discutido que os mecanismos neurais de navegação espacial sejam



também usados na “navegação” por memórias declarativas, função também dependente do HPC (EICHENBAUM, 2017; HERWEG; SOLOMON; KAHANA, 2020). Fora da navegação, a atividade teta correlaciona positivamente, ou impacta se prejudicada, a performances em várias tarefas de aprendizado e memória, e tem sido investigada nos processos de aquisição, consolidação, evocação e extinção de memórias (KOROTKOVA et al., 2018). Outro grupo de achados notável é de que diferentes tarefas que envolvem controle cognitivo evocam respostas oscilatórias na faixa de teta no córtex frontal medial (CAVANAGH; FRANK, 2014). Estes achados são bem estabelecidos em humanos, mas também ocorrem em roedores (CAVANAGH et al., 2021). Em suporte ao papel de teta na cognição, além dos achados comportamentais, as oscilações teta são reguladoras finas de plasticidade sináptica. A frequência ótima de estimulação para indução de potenciação de longa duração em CA1 é na frequência teta (LARSON; MUNKÁCSY, 2015; LARSON; WONG; LYNCH, 1986) e um pulso elétrico aplicado em CA1, quando a onda está no pico, induz potenciação de longa duração, mas induz depressão de longa duração ou despotenciação se aplicado no vale (HÖLSCHER; ANWYL; ROWAN, 1997; HYMAN et al., 2003).

Outro aspecto relevante é o da integração sensório-motora (BLAND; ODDIE, 2001). Evidências interessantes nesta perspectiva, são de que alguns comportamentos são acoplados às oscilações teta (NUÑEZ; BUÑO, 2021). Durante boa parte do meu doutorado estávamos dedicados a encontrar correlatos oscilatórios de comportamentos inatos classicamente indicativos de resiliência em testes de avaliação de comportamento depressivo, em especial, durante nado forçado, preferência por sacarose e interação social. Para isso, desenvolvemos sistemas de registro com dispositivos eletrônicos capazes de transduzir atividade comportamental em sinais elétricos digitais de modo a obter uma relação temporal fina entre eventos comportamentais e LFPs. Para nossa surpresa, observamos que a atividade motora durante estes comportamentos (chutes durante nado, lambidas em solução de sacarose, movimento da cabeça durante interação social) apresentava natureza rítmica em frequências (4-12 Hz) correspondentes às oscilações teta, o que sugere uma relação funcional. Descrevo os dispositivos desenvolvidos, as análises de sinal implementadas, os resultados preliminares e faço uma discussão mais detalhada

destes achados com relação à função de integração sensório-motora das oscilações teta no apêndice.

### *1.4.3. Funções emocionais: relações com medo, ansiedade e depressão*

#### *1.4.3.1. Teta e medo*

Enquanto isso, os aspectos emocionais, que são de particular importância no enfrentamento ao estresse, foram muito menos explorados na literatura. A grande maioria dos estudos focou em investigações da atividade em contextos aversivos, relatando aumentos da potência e coerência em teta associados à exposição a predadores, medo condicionado, ansiedade inata e coespecíficos agressivos. Enquanto a influência de estímulos e contextos aversivos na evocação do teta hipocampal foi rapidamente demonstrada nas descrições pioneiras, as primeiras evidências de que este processamento ocorria em uma rede mais ampla vieram de estudos do grupo de Hans Pape que registraram a atividade no protocolo de medo condicionado (SEIDENBECHER et al., 2003). Então, vários outros trabalhos mostraram o engajamento da potência e sincronia da rede HPC-PFC-AMG em protocolos de aprendizado aversivo em roedores e primatas, mostrando que esta atividade se associava à aquisição, expressão, evocação e dificuldade de extinção destas memórias (BARKUS et al., 2014; LIKHTIK; PAZ, 2015; LIVNEH; PAZ, 2012; PAPE et al., 2005; PAPE; PARE, 2010).

No entanto, notam-se algumas contradições na literatura. Nesse sentido, trabalhos do grupo de Cyril Herry mostraram que durante o congelamento ocorria a sincronização PFC-AMG na frequência de 4 Hz, e não teta, a qual era independente de atropina. Ademais, mostraram que a abolição de teta não alterava a manifestação de congelamento (KARALIS et al., 2016). Pouco tempo depois, alguns autores apontaram, e os próprios autores do estudo confirmaram que esta oscilação de 4 Hz era um ritmo neural acoplado à respiração (KARALIS; SIROTA, 2018), não tendo relação direta com medo em si. Outro trabalho do grupo mostrou que o reinício da fase de teta no PFC, que ocorria pela apresentação do CS+, estava envolvida na expressão de medo. Além disso, mostraram que esta atividade é controlada por interneurônios locais do PFC e não dependiam do teta hipocampal (COURTIN et al., 2014). Por fim, essas controvérsias indicam que ainda não está claro quais aspectos

dos estímulos aversivos estão associados ao engajamento ou não da sincronia em teta límbico-cortical.

Por outro lado, alguns trabalhos evidenciaram que a direcionalidade de teta pode estar associada ao controle *top-down* do PFC sobre a AMG em momentos de segurança. Lesting et al. mostraram o aumento da sincronia HPC-PFC-AMG durante aprendizado de medo, mas uma mudança na direcionalidade entre IL e AMG durante a extinção (LESTING et al., 2011, 2013). Seguindo estes achados, um dos trabalhos que mais se destacaram foi de Likhtik et al., em que realizaram um protocolo de discriminação de medo e categorizaram camundongos que apresentavam discriminação ou generalizavam suas respostas para CS+ e CS-. Então, foi observado que os animais discriminadores apresentavam maiores potências e coerências em teta entre PFC e AMG e, nestes animais, ocorria maior sincronia nas condições de medo, enquanto nas situações de segurança ocorria uma mudança da direcionalidade entre PFC e AMG de modo que o PFC passava a arrastar a atividade neuronal da AMG. No mesmo estudo, viram que esta mesma direcionalidade acontecia nos cantos do campo aberto, que também representam situações de segurança (LIKHTIK et al., 2014). Em um estudo complementar, observaram que a atividade em teta do PFC acoplava oscilações gama alto da AMG durante segurança, enquanto teta e gama locais da AMG se acoplavam durante medo, representando outros marcadores de regulação corticolímbica (STUJENSKE et al., 2014). Estes estudos, ao mesmo tempo que confirmam os achados prévios do aumento das potências e coerência em teta durante aversão, mostram que esta mesma atividade pode fundamentar processos relacionados à discriminação e segurança via mudanças na direcionalidade (LIKHTIK; PAZ, 2015). Apesar dos resultados elegantes, estes trabalhos relatam que o CS-, mesmo para animais discriminadores, não gerava a supressão de medo, mas apenas evocava menos congelamento do que o CS+. Isso significa que este estímulo não é definido como um inibidor condicionado pelos critérios de somação e retardo de Rescorla. Assim, a investigação destas atividades em um protocolo que explicita a associação de CSs a segurança ou medo poderia corroborar, complementar ou refutar estes achados.

#### 1.4.3.2. Teta e ansiedade

A associação de teta com ansiedade se iniciou a partir de experimentos mostrando que benzodiazepínicos diminuía a atividade e que lesões no sistema septohipocampal promoviam comportamentos ansiolíticos em roedores. Com base nestes achados, Gray (1982) propôs que o sistema septohipocampal atuaria como um sistema de inibição comportamental em situações de conflito e aversão e que a atividade teta seria o substrato neurofisiológico destes processos. Estudos farmacológicos mais recentes passaram a apontar que ansiolíticos, independentemente de mecanismos de ação, atuam preferencialmente modulando a frequência de teta (KOROTKOVA et al., 2018; MCNAUGHTON; KOCSIS; HAJÓS, 2007). A implicação mais direta da atividade teta com ansiedade inata veio de uma série de estudos elegantes do grupo de Joshua Gordon, atual diretor do NIMH, utilizando o labirinto em cruz elevado (LCE). Inicialmente, mostraram que camundongos *knockout* para receptor 5-HT1A, que apresentam várias alterações comportamentais indicativas de traço ansioso, apresentavam maior potência em teta no DH (GORDON, 2005). Em um trabalho seminal, Adhikari et al. (2010) mostraram que no LCE ocorre o aumento das potências e coerência em teta entre o VH e o PFC, mas não entre o DH e o PFC. Neste estudo, observaram esta maior atividade em geral dentro do LCE, comparado a um ambiente familiar, e viram que o aumento da sincronia predizia que os animais saíssem dos braços abertos em direção aos braços fechados e era mais robusta dentro dos braços fechados (esquiva) (ADHIKARI; TOPIWALA; GORDON, 2010). Em outros estudo, mostraram que neurônios do PFC, que codificam os braços ansiogênicos vs. seguros, eram acoplados ao teta do VH (ADHIKARI; TOPIWALA; GORDON, 2011) e que a inibição desta projeção prejudicava tal codificação e desacoplava estes neurônios (PADILLA-COREANO et al., 2016). Mais recentemente, realizaram estimulação optogenética senoidal em teta da via, com o intuito de simular o LFP endógeno, e viram que esta forma de estimulação era mais eficiente do que em pulsos ou em outras frequências na promoção de esquiva para os braços fechados (PADILLA-COREANO et al., 2019). Estes resultados são contundentes em relacionar teta com motivação aversiva (esquiva). No entanto, o LCE, como discutido anteriormente (seção 1.3.2.), é um ambiente inteiro aversivo e o aspecto positivo da situação, i.e., a recompensa consequente da exploração, não é claro. Portanto, um desenho experimental que delimite melhor as valências

motivacionais com incentivos equivalentes pode revelar se a sincronia em teta é, de fato, mais fortemente associada à motivação negativa.

#### 1.4.3.3. Teta e depressão

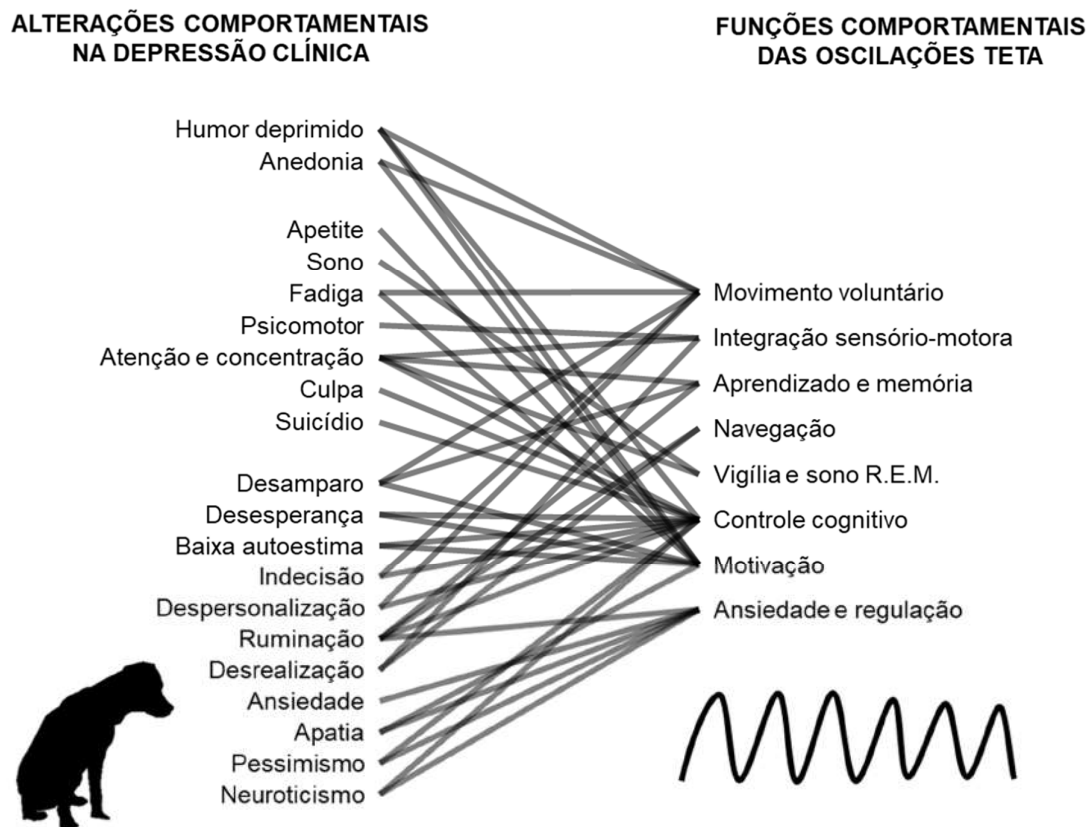
Atividade oscilatória em modelos experimentais de depressão foram muito menos explorados do que de medo e ansiedade, e nenhum marcador próximo de prova de princípio ainda foi encontrado. De maior destaque, foram os estudos do grupo de Kafui Dzirasa investigando preditores oscilatórios de vulnerabilidade à derrota social crônica em camundongos. Usando este modelo, o estudo mais impactante foi de Hultman et al., que registraram os LFPs de sete regiões e implementaram um modelo de aprendizado de máquina supervisionado para descobrir padrões que predissessem indivíduos suscetíveis pelas atividade dos espectros de potência, coerência e direcionalidade. Estes padrões de conectoma funcional por atividade elétrica foram denominados *electomas* (HULTMAN et al., 2018). Neste estudo, a época utilizada para identificar tais padrões foi durante a exposição dos camundongos C57BL/6J, presos em uma jaula pequena, a um dominante agressivo de uma linhagem maior (CD1), ou seja, uma situação de medo. O algoritmo do estudo identificou um padrão que predizia animais suscetíveis com boa acurácia e era caracterizado pelo aumento das potências e coerência entre as múltiplas regiões na faixa de 8-20 Hz, com maiores proeminências em 10 Hz (HULTMAN et al., 2018). Apesar dos autores não mencionarem o termo “teta” no artigo, esta faixa apresenta intersecção relevante com as frequências teta.

György Buzsáki, um dos principais pesquisadores sobre a origem e função das oscilações teta, comenta:

*After 50 years and hundreds of experiments, there is no widely accepted term that would unequivocally describe behavioral correlate(s) of hippocampal  $\theta$  oscillation (BUZSÁKI, 2005).*

O autor critica a busca por correlatos neurais de funções cognitivas-comportamentais, por serem enviesadas por premissas e categorias arbitrárias de função mental criadas pela linguagem humana (e.g., “atenção”, “cognição”, “emoções” etc). Neste sentido, ele faz uma crítica particular à busca por correlatos de oscilações neurais, em geral, e das oscilações teta, em específico, uma vez que estas participam em um grande número de funções cognitivas e comportamentais, portanto, teriam correlatos bastante inespecíficos. Ao mesmo tempo, o autor segue com a

consideração de que funções mentais consideradas diferentes *a priori*, uma vez que compartilham bases neurofisiológicas em comum, podem não ser entidades realmente distintas, mas representam uma função única (BUZSÁKI, 2020; BUZSÁKI, 2021). Deste modo, a inespecificidade de correlatos comportamentais de uma atividade neural é necessariamente um problema? Curiosamente, notamos que muitas das funções propostas das oscilações teta, quando alteradas, correspondem a disfunções que caracterizam sintomas da depressão maior (Fig. 10). Em apoio, uma meta-análise recente indicou a atividade em teta frontal como o marcador eletroencefalográfico de resposta a tratamentos para depressão mais consistente, já tendo sido relacionado a resposta por medicamentos, estimulação magnética transcraniana, estimulação cerebral profunda, terapia eletroconvulsiva, e, até mesmo, placebo (WIDGE et al., 2019). Além disso, com base nos achados de que estimulação na frequência teta em pulsos espaçados na frequência de gama induzia plasticidade sináptica, foi difundida a utilização de uma estimulação similar no PFC como



**Figura 10** – Possíveis relações entre alterações comportamentais presentes na depressão clínica e as principais funções comportamentais atribuídas às oscilações teta.

tratamento para depressão, conhecida como *theta-burst stimulation* (TBS) (CHUNG; HOY; FITZGERALD, 2015). Esta forma de estimulação foi recentemente elaborada para uma exposição intermitente em combinação com dados de conectividade funcional por neuroimagem para determinação de alvo anatômico personalizado. Este método de TBS promoveu remissão de 90,5% de pacientes com depressão resistente em um primeiro estudo de rótulo aberto (COLE et al., 2020), e de 78,6% em um estudo maior (COLE et al., 2021).

As oscilações teta são compreendidas como o estado “*on-line*” do HPC (BUZSÁKI, 2002), que é uma das regiões mais consistentemente afetadas na depressão clínica e em modelos animais de estresse crônico (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003). Portanto, poderia ser esperado que esta atividade também estaria afetada nestas condições. De fato, há evidências de que estresse crônico em roedores reduz potências e sincronia corticolímbica em teta (ZHENG; ZHANG, 2015), particularmente em indivíduos suscetíveis e, especialmente, em fêmeas (THÉRIAULT; MANDUCA; PERREAULT, 2021). Além disso, pacientes com depressão e modelos de estresse crônico apresentam maior frequência de sono paradoxal, ou R.E.M. (*rapid eye movement*), que é característico por apresentar forte atividade teta global. Porém, alguns estudos mostram que o aumento da frequência desse estágio após estresse é acompanhada por menores potências e coerência em teta durante eles (HEGDE et al., 2011; MATSUDA et al., 2021).

Os achados clínicos coincidem com nossos achados indicando aumento de teta no PFC relacionado à resiliência. Em concordância, colaborei na elaboração dos projetos de doutorado do Dr. Matheus T. Rossignoli e de mestrado do Me. Fernando F. Mecca que investigaram a atividade eletrofisiológica do PFC e AMG no modelo triádico com a adição de um grupo de animais submetidos a IS mas tratados com escitalopram, um antidepressivo inibidor seletivo de recaptção de serotonina amplamente usado na clínica. Estes trabalhos mostraram que animais IS tratados desenvolviam menos comportamento de desamparo do que IS não tratados, demonstrando a validade preditiva do modelo. Incrivelmente, estes trabalhos replicaram com precisão nossos achados anteriores de que animais resistentes durante ES apresentam aumento de teta no PFC enquanto animais desamparados durante IS apresentam uma redução (ROSSIGNOLI, 2018). Porém, surpreendentemente, observamos que animais IS tratados apresentavam uma

facilitação da potência de teta frontal, que se apresentou ainda maior do que a de animais ES (MECCA, 2019). Este achado corrobora a relevância clínica da atividade teta frontocortical observada em nosso modelo experimental e encoraja maiores investigações da sua relação com a resistência ao estresse.

Linhas paralelas de evidência apontam que o DH e o “teta 1” são mais relacionados à cognição-translocação, enquanto o VH e o “teta 2” à emoção-ansiedade (FANSELOW; DONG, 2010; ROYER et al., 2010). De acordo, o teta 1 é marcante no DH e recentemente foi mostrado que o teta 2, sensível ao odor de um predador, pode ser manipulado no VH pelo controle optogenético de células O-LM (MIKULOVIC et al., 2018). Esta distinção anatômica e funcional implica que diferentes oscilações teta poderiam, de fato, subjazer diferentes funções comportamentais. No entanto, ondas teta se propagam por todo o HPC de forma unificada, evidenciado pela mudança gradual de fase ao longo do eixo septotemporal (LUBENOV; SIAPAS, 2009). Além disso, preparações *in vitro* do HPC apresentam coerência em teta entre os polos septal e ventral, que é perdida se porções intermediárias são inibidas, indicando mecanismos internos que garantem esta integração (GOUTAGNY; JACKSON; WILLIAMS, 2009). Ademais, foi mostrado que a sincronia em teta entre o DH e o PFC durante uma tarefa de memória de trabalho ocorre via VH (O’NEILL; GORDON; SIGURDSSON, 2013) e muitos experimentos importantes implicando atividades em teta na ansiedade foram realizados no DH (GORDON, 2005; MCNAUGHTON; KOCSIS; HAJÓS, 2007; SEIDENBECHER et al., 2003). Portanto, é possível compreender as oscilações teta como um fenômeno unitário no HPC, o que, por sua vez, sugere que suas funções comportamentais talvez sejam indissociáveis.

De modo geral, os achados de correlatos emocionais de teta foram interpretados como sugerindo sua participação em situações de vulnerabilidade em modelos de estresse pós-traumático, ansiedade e depressão (ÇALIŞKAN; STORK, 2019; GRAY, 1982; OKONOGLI; SASAKI, 2021; PAPE; PARE, 2010). Neste contexto, o papel cognitivo das oscilações foi adicionado principalmente como um mecanismo na formação exagerada de memórias aversivas. Mas a relação entre as funções emocionais, cognitivas e sensório-motoras de teta poderia se dar de uma forma mais complexa e integrada? Os efeitos positivos na clínica e o papel fundamental adaptativo em uma diversidade de funções cognitivas contrastam com as propostas simplistas inclinadas a sugerir a participação de teta em processos emocionais mal-



adaptativos. Além disso, estas interpretações são derivadas de experimentos que modelaram situações aversivas mas que não realizaram uma clara definição dos aspectos adaptativos durante estas situações. Assim, a delimitação destas dimensões pode ajudar a esclarecer o papel de atividades oscilatórias no enfrentamento ao estresse.

Usando a estrutura de investigação proposta aqui (seção 1.3.), este trabalho teve o objetivo de localizar os correlatos oscilatórios de enfrentamento ao estresse em suas dimensões psicobiológicas (Fig. 1). Os achados iniciais sobre a modulação da atividade em teta na rede HPC-PFC nos motivaram a realizar uma caracterização compreensiva das atividades oscilatórias (potência, sincronia, frequência, reinício de fase, acoplamento entre frequências e acoplamento neuronal) durante estresse controlável e incontrolável e investigar padrões multivariados capazes de prever indivíduos resistentes ou desamparados (Artigo I). Enquanto as dinâmicas oscilatórias envolvidas no processamento da controlabilidade eram desconhecidas, evidências de sincronia em teta no medo condicionado e ansiedade inata eram bem relatadas. No entanto, como esta atividade ocorre em uma rede encefálica mais ampla, incluindo PL, IL, NAc, AMG, DH, VH e VTA (mesolímbica-hipocampo-frontocortical), e se manifesta em um modelo que explicita mais claramente estados de medo *versus* segurança e aproximação *versus* esquiva é incerto. Então, exploramos como diferentes características oscilatórias (potência, sincronia e direcionalidade) e conjuntos de regiões poderiam decodificar estados de segurança e valência em diferentes animais usando um algoritmo de aprendizado de máquina (Artigo II). Portanto, este trabalho é a investigação de padrões multivariados de atividade oscilatória, especialmente relacionadas às frequências teta, envolvidos no processamento em rede de controlabilidade, segurança e valência em situações de estresse a partir de desenhos experimentais que delimitam os aspectos adaptativos e mal-adaptativos de tais dimensões.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

Identificar atividades de potenciais de campo locais e possíveis padrões multivariados que revelam função de redes neurais relacionados à controlabilidade, segurança e valência motivacional em modelos experimentais de enfrentamento ao estresse.

### **2.2. Objetivos específicos**

- a) Identificar atividades oscilatórias (potência, coerência de fase, acoplamento entre frequências, frequências de pico, reinício de fase, taxa de disparos neuronais, acoplamento entre disparos unitários e potenciais de campo) e respectivos padrões multivariados na rede hipocampo-córtex pré-frontal durante estresse controlável ou incontrolável com capacidade de prever indivíduos resistentes ou desamparados contra futuros estressores (Artigo I).
- b) Identificar atividades oscilatórias (potência, coerência de fase, diferença de fase) e respectivos padrões multivariados na rede mesolímbica-hipocampo-frontocortical com capacidade de decodificar estados de estresse ou segurança e aproximação ou esquiva em um novo desenho experimental (Artigo II).
- c) Desenvolver um sistema de registros eletrofisiológico e comportamental simultâneos para investigação da relação entre atividades oscilatórias e eventos comportamentais relevantes para ansiedade e depressão (nado forçado, preferência por sacarose e interação social) (Apêndice).

### 3. ARTIGOS

#### 3.1. ARTIGO I - Correlatos neurais da controlabilidade sobre o estresse

A avaliação de adversidades como controláveis ou incontroláveis é fundamental para determinar resiliência ou risco de transtornos relacionados ao estresse. Aqui realizamos a primeira investigação eletrofisiológica durante o estresse controlável ou incontrolável. Estudos farmacológicos mostraram que o córtex pré-frontal (PFC) e o hipocampo (HPC) codificam a controlabilidade sobre estressores, e aqui identificamos a atividade neural subjacente a esse processo. Esta 'assinatura neural do controle sobre estressores' previu com precisão a resistência a estressores futuros e foi caracterizada pelo aumento da atividade oscilatória do HPC-PFC na frequência teta (4-10 Hz). Nossos resultados sugerem um novo papel das oscilações teta frontais no enfrentamento adaptativo do estresse, integrando suas funções emocionais e cognitivas. Também endossamos o potencial deste biomarcador para guiar terapias informadas por neurofisiologia e de estimulação rítmica para a depressão. Este artigo está publicado em: [10.1523/JNEUROSCI.0128-21.2021](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0128-21.2021).

#### Destaques

- a) Indivíduos resistentes (controle sobre estressores) são preditos por um padrão que consiste no aumento da potência e sincronia em teta na rede HPC-PFC durante antecipação de estímulos aversivos e acoplamento teta-gama no PFC.
- b) Indivíduos desamparados (falta de controle sobre estressores) são preditos pela ausência da assinatura neural da controlabilidade e presença dos marcadores do estresse *per se*.

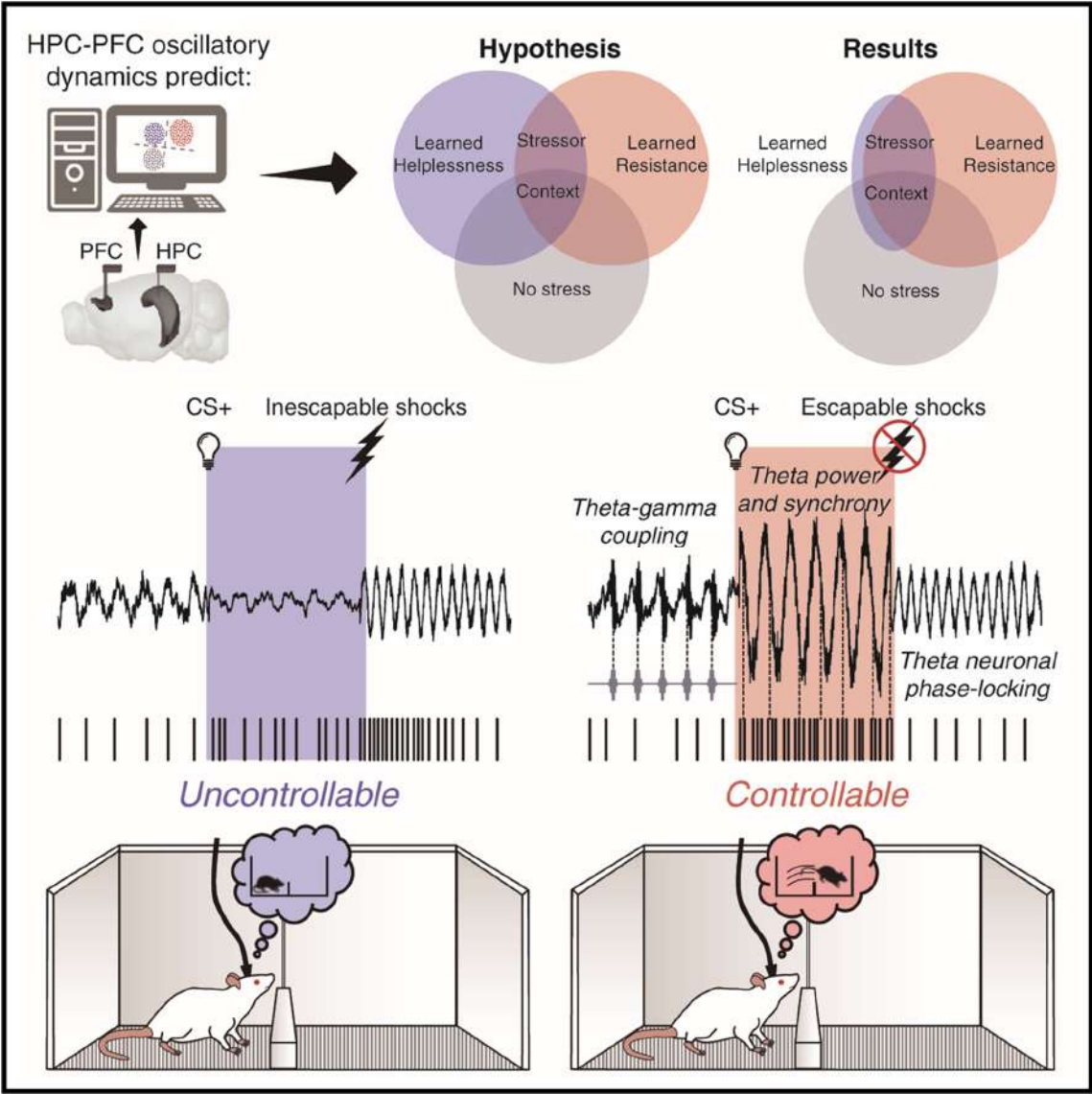


Figure 11 – Resumo gráfico do artigo I.

# Prediction of Learned Resistance or Helplessness by Hippocampal-Prefrontal Cortical Network Activity during Stress

Daniilo Benette Marques\*, <sup>15</sup>Rafael Naime Ruggiero\*, Lezio Soares Bueno-Junior<sup>†</sup>, Matheus Teixeira Rossignoli<sup>†</sup>, and <sup>15</sup>João Pereira Leite

Department of Neuroscience and Behavioral Sciences, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil

The perception of control over a stressful experience may determine its impacts and generate resistance against future stressors. Although the medial prefrontal cortex (PFC) and the hippocampus (HPC) are implicated in the encoding of stressor controllability, the neural dynamics underlying this process are unknown. Here, we recorded HPC and PFC neural activities in male rats during the exposure to controllable, uncontrollable, or no shocks and investigated electrophysiological predictors of escape performance upon exposure to subsequent uncontrollable shocks. We were able to accurately discriminate stressed from nonstressed animals and predict resistant (R) or helpless (H) individuals based on hippocampal-cortical oscillatory dynamics. Remarkably, R animals exhibited an increase in theta power during CS, while H exhibited a decrease. Furthermore, R exhibited higher HPC to PFC  $\theta$  synchronization during stress. Notably, HPC-PFC  $\theta$  connectivity in the initial stress exposure showed strong correlations with escape performance evaluated days later. R rats also showed stronger  $\theta$  coupling to both  $\gamma$  oscillations and neuronal firing in the PFC. Finally, we found that these distinct features of network dynamics collectively formed a pattern that accurately predicted learned resistance and was lacking in H individuals. Our findings suggest that hippocampal-prefrontal network  $\theta$  activity supports cognitive mechanisms of stress coping, whose impairment may underlie vulnerability to stress-related disorders.

**Key words:** depression; electrophysiology; hippocampus; prefrontal cortex; resilience;  $\theta$  oscillations

## Significance Statement

The appraisal of adversities as controllable or uncontrollable is key in determining resilience or risk for stress-related disorders. Here, we performed the first electrophysiological investigation during controllable or uncontrollable stress. Pharmacological studies showed that the prefrontal cortex (PFC) and the hippocampus (HPC) encode stressor controllability, and here we identified the neural activity underlying this process. This “neural signature of stressor controllability” accurately predicted resistance to future stressors and was characterized by increased HPC-PFC oscillatory activity in the  $\theta$  frequency (4–10 Hz). Our findings suggest a new role of frontal  $\theta$  oscillations in adaptive stress coping, integrating its emotional and cognitive functions. We also endorse the potential of this biomarker to guide neurophysiologically-informed and rhythm-based stimulation therapies for depression.

Received Jan. 19, 2021; revised Nov. 2, 2021; accepted Nov. 4, 2021.

Author contributions: D.B.M. and R.N.R. designed research; D.B.M. and M.T.R. performed research; D.B.M., R.N.R., and L.S.B.-J. analyzed data; D.B.M. and R.N.R. wrote the first draft of the paper; D.B.M., R.N.R., L.S.B.-J., M.T.R., and J.P.L. edited the paper; D.B.M., R.N.R., L.S.B.-J., M.T.R., and J.P.L. wrote the paper.

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development Grants 134102/2013-4 (to D.B.M.) and 423977/2016-4 (to J.P.L.), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel Grant 88882.328283/2019-01 (to D.B.M.), and São Paulo Research Foundation Grants 2018/02303-4 (to R.N.R.), 2012/06123-4 (to L.S.B.-J.), 2011/04467-5 and 2020/01510-6 (to M.T.R.), and 2016/17882-4 (to J.P.L.). We thank Luis Fernando Luca, Antonio Renato Meirelles e Silva, Renata Galdo Scanduzzi, and Daniela Ribeiro for technical support. We also thank Cláudia Maria Padovan, Maria Helena Hunziker, Frederico Graeff, and Nuno Sousa for discussions.

L.S.B.-J. current address: University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI 48109-5624.

\*D.B.M. and R.N.R. share first co-authorship.

<sup>†</sup>L.S.B.-J. and M.T.R. contributed equally to this work.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Rafael Naime Ruggiero at rafaruggiero@usp.br or rafaruggiero@gmail.com.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0128-21.2021>

Copyright © 2022 the authors

## Introduction

The perception of control over a stressful experience is critical to determine its impacts on the individual (Southwick and Charney, 2012; Cathomas et al., 2019). Generalized expectations that adversities are uncontrollable is a common factor underlying most stress-related psychiatric illnesses, such as depression, anxiety, and posttraumatic stress disorder. Conversely, the appraisal of challenging situations as manageable is associated with resilience and positive outcomes (Kalisch et al., 2015; Feder et al., 2019). Similarly, in experimental models, learning that aversive events are controllable or uncontrollable drives the acquisition of long-term resistance or vulnerability against future stressors, respectively (Maier and Seligman, 1976, 2016). Rats exposed to uncontrollable inescapable shocks (IS) exhibit deficient escape learning, a phenomenon known as “learned helplessness” (Seligman and Maier, 1967), which parallels with potentiated anxiety, delayed

fear extinction (Shors et al., 1989; Maier and Watkins, 1998, 2005; Amat et al., 2005, 2010; Baratta et al., 2007), and numerous biological effects that bear translational validity with clinical depression and anxiety disorders (Willner, 1984; Maier and Watkins, 1998; Pryce et al., 2011; Vollmayr and Gass, 2013). In contrast, subjects exposed to equivalent controllable escapable shocks (ES) do not present such alterations, and in addition, become resistant (R) against subsequent IS (Amat et al., 2006; Baratta et al., 2007; Maier, 2015).

Maier and colleagues demonstrated that prefrontal cortex (PFC) inhibition abolishes the protective effects of stressor controllability in a wide range of behavioral and physiological outcomes (Amat et al., 2005, 2006; Maier, 2015). Many reports also show that the hippocampus (HPC) is differentially sensitive to controllable and uncontrollable stress (Shors et al., 1989; Balleine and Curthoys, 1991; Amat et al., 1998), and that intrahippocampal administration of antidepressants prevents the development of helplessness after IS (Joca et al., 2003). Moreover, hippocampal-prefrontal cortical functional connectivity (Thierry et al., 2000; Gordon, 2011) is modulated by both stress and antidepressants, and participates in both emotional and higher-order cognitive processes that are dysfunctional in stress-related disorders (Jay et al., 2004; Godsil et al., 2013). Although it has been well established that PFC and HPC play critical roles in encoding stressor controllability, the neural dynamics underlying this process remain unknown.

Here, we hypothesized that the encoding of stressor controllability and uncontrollability would be associated with distinct patterns of neural activity related to HPC and PFC interaction during stress. To test this hypothesis, we recorded HPC and PFC local field potentials (LFP) and single-unit activity in rats during the exposure to either ES, yoked IS, or no shocks (NS), all of which signaled by identical conditioned stimuli (CSs). Then, we explored electrophysiological predictors of learned resistance or helplessness to subsequent uncontrollable shocks, as determined by later escape performance. We found an unprecedented association between stressor controllability and enhanced HPC-PFC  $\theta$  power and synchrony, as well as PFC local  $\theta$  phase coupling to both fast oscillations and neuronal firing during the anticipation of aversive stimuli. We were also able to implement a linear discriminative model that accurately distinguished stressed from nonstressed animals and predicted R individuals based solely on oscillatory dynamics. Our results indicate that PFC  $\theta$  activity entrained by HPC underlies the encoding of stressor controllability, and the lack of this protective activity may allow the development of helplessness in the face of severe stress.

## Materials and Methods

### Subjects

Adult male Wistar rats (8–10 weeks old) were single housed singly in bedded cages in a controlled-temperature room ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) on a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 7 A.M.) with *ad libitum* access to food and water. The procedures followed the National Council for the Control of Animal Experimentation guidelines and were approved by the local Committee on Ethics in the Use of Animals (Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, protocol 156/2014).

### Electrode implantation surgery

Animals were anesthetized with ketamine and xylazine (respectively, 50 and 25 mg/kg, *i.p.*), followed by 70 and 35 mg/kg, *i.m.*). Body temperature was kept constant during the entire procedure by a heating pad ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

Chronic head caps consisted of a bilateral pair of eight-channel connectors (Omnetics): seven channels for each PFC, one channel for each HPC. Electrode impedance range was  $672 \pm 28 \text{ K}\Omega$  (mean  $\pm$  SEM). PFC electrodes consisted of microwire bundles (7 Teflon-coated tungsten,  $50 \mu\text{m}$ ) into both prelimbic areas (ventral: 3.2 mm, anterior: 3.0 mm, lateral:  $\pm 0.5$  mm; bregma-referenced coordinates; Bueno-Junior et al., 2018). Intermediate HPC areas were each implanted with a monopolar electrode targeted at the CA1 region (ventral: 2.5 mm, posterior: 5.7 mm, lateral:  $\pm 4.4$  mm; Ruggiero et al., 2018). After implantation and fixation of the electrodes, the HPC electrodes were cut and soldered to the remaining available pins of the eight-channels connectors. In addition to the electrodes, microscrews were fastened into the skull, including a ground reference in the interparietal bone area. Electrodes and screws were then cemented together with acrylic resin. Analgesic, antipyretic, and antibiotic drugs were injected after surgery. Animals were allowed to recover for 8–9 d before stress exposure.

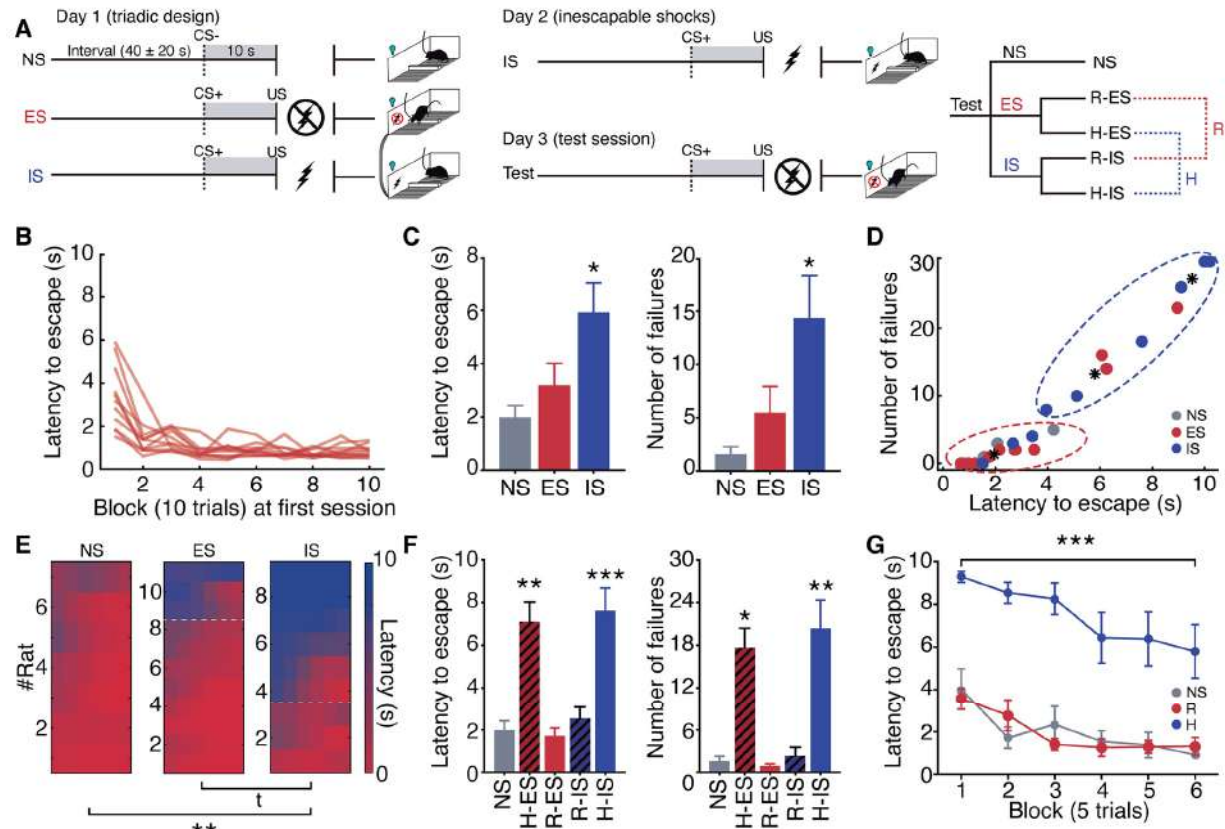
### Apparatus

We customized a shuttle box system for simultaneous electrophysiological recording, shock delivery, and behavioral monitoring. The system included a relay switch between the recording cable and the preamplifier (see below, Extracellular recordings). Based on pilot tests, automatically turning off this switch during footshocks (at millisecond precision) was proven necessary to avoid grounding through the recording cable, thus assuring consistency of shock intensity. The behavioral apparatus was located inside a soundproof box, and consisted of a chamber (54-cm length  $\times$  50-cm height  $\times$  33-cm width) divided in two compartments by a removable wall (1-cm length  $\times$  1.5-cm height). Footshocks were delivered through stainless steel bars on the floor (see below, Experimental design). The apparatus contained eight equally spaced infrared beams, four per compartment, to track position and translocation.

### Experimental design

All behavioral procedures were performed during the light phase (8 A.M. to 6 P.M.) in a controlled-temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) dark room (0 lux). On day 1, rats were divided into three groups according to the triadic design of behavioral immunization (modified protocol from Amat et al., 2006). Animals underwent ES, yoked IS, or NS (Fig. 1A). ES animals were submitted to 100 trials consisting of a CS ( $\text{CS}^+$ , LED light, 200 lux, 10-s fixed duration), immediately followed by the unconditioned stimulus (US; footshock, 0.6 mA, 10-s maximum duration, unless terminated by escape behavior). Intertrial intervals were in the range of  $40 \pm 20$  s, randomly. ES animals were allowed to escape by jumping the short wall between compartments. Each animal of the IS group was paired (*i.e.*, yoked) with one of the ES group, such that they were also exposed to  $\text{CS}^+$  and footshocks of equivalent intensity and durations matched trial-wise. However, IS animals could not terminate shocks by wall jumping as it would for the ES counterparts. NS animals were exposed only to the CS. Thus,  $\text{CS}^+$  were paired with shocks (either ES or IS) while  $\text{CS}^-$  were not. On day 2, both ES and IS animals were exposed to 40 trials of uncontrollable IS of 10-s fixed duration. On day 3 (the test session), resistant or helpless behaviors were determined by evaluating escape performance across 30 trials of ES in the same shuttle box apparatus (adapted from Joca et al., 2003). The wall between compartments was removed in the test session to modify the escape response from jumping to running. Changing the behavioral responses between exposure and test substantiates the generalization of either controllability or helplessness to later stressors in studies investigating differential effects of ES versus IS (Maier and Seligman, 1976; Maier, 2015). Thus, animals could terminate each shock by crossing a single time (*i.e.*, fixed ratio 1) between compartments. Trials where the animal did not perform the escape response during the entire shock duration were considered as failures. Behavioral responses were recorded by an automatized software, and all sessions were video monitored.

To classify R versus H individuals, we used k-means clustering (three clusters) with two behavioral dimensions from the test session: mean latency to escape and total number of failures (Vollmayr and Henn, 2001; Wang et al., 2014). All NS animals were included in the cluster with the best escape performance. ES or IS animals that were clustered together



**Figure 1.** The triadic design of stress exposure induces learned resistance and helplessness. **A**, Triadic design of stress exposure (day 1) and “immunization” protocol (see Materials and Methods). **B**, All ES animals learned the escape response at the first exposure. **C**, IS induced greater mean latency to escape and number of failures in the test session. **D**, K-means clustering of R and H individuals. **E**, Latency to escape across blocks. H animals are above the dashed line. IS induced higher proportion of H animals ( $^*p < 0.05$ ,  $\chi^2$  test). **F**, R and H animals exhibited markedly distinct behaviors in the test session. **G**, R and NS animals showed identical behavior in the test session. H animals exhibited delayed escape learning. Here and on: ES = escapable shocks, IS = inescapable shocks, NS = no shocks, R = resistant, H = helpless, CS = conditioned stimulus (light), US = unconditioned stimulus (shock).  $^{\dagger}p < 0.1$ ,  $^*p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{***}p < 0.001$ . Error bars represent the mean  $\pm$  SEM.

with NS were labeled as R, while all others in the poor-performance clusters were labeled as H. Other statistical criteria based on NS behavior, such as the maximum, mean plus two standard deviations, and Tukey’s fences outlier range returned the same results, validating our behavioral labeling.

#### Extracellular recordings

Electrophysiological signals were recorded during behavioral sessions, interrupted only during footshocks (see above, Apparatus). A multi-channel acquisition processor (Plexon) was used to record LFPs and multiunit activity (MUA) with the following parameters. LFP: 1000 $\times$  gain, 0.7- to 500-Hz bandpass filter, 1-kHz sampling rate. MUA: 1000 $\times$  gain, 150- to 8000-Hz bandpass filter, 40-kHz sampling rate. Timestamps were acquired from the behavioral apparatus at 40-kHz sampling for peristimulus analyses.

#### Histology

Immediately after the test session, animals were euthanized with CO<sub>2</sub> asphyxiation, and electrolytic lesion currents (1 mA) were applied between pairs of wires. After decapitation, each brain was placed in a cassette for immersion in 4% paraformaldehyde (PFA) overnight ( $-20^{\circ}$  C), followed by 70% ethanol, and paraffin for coronal sectioning at the microtome. Standard cresyl-violet staining was used to validate electrode positioning under the bright-field microscope. Based on histology, we excluded one animal from all analyses, and one animal from HPC analysis. Other five animals were excluded because of electrical noise or excessive locomotion.

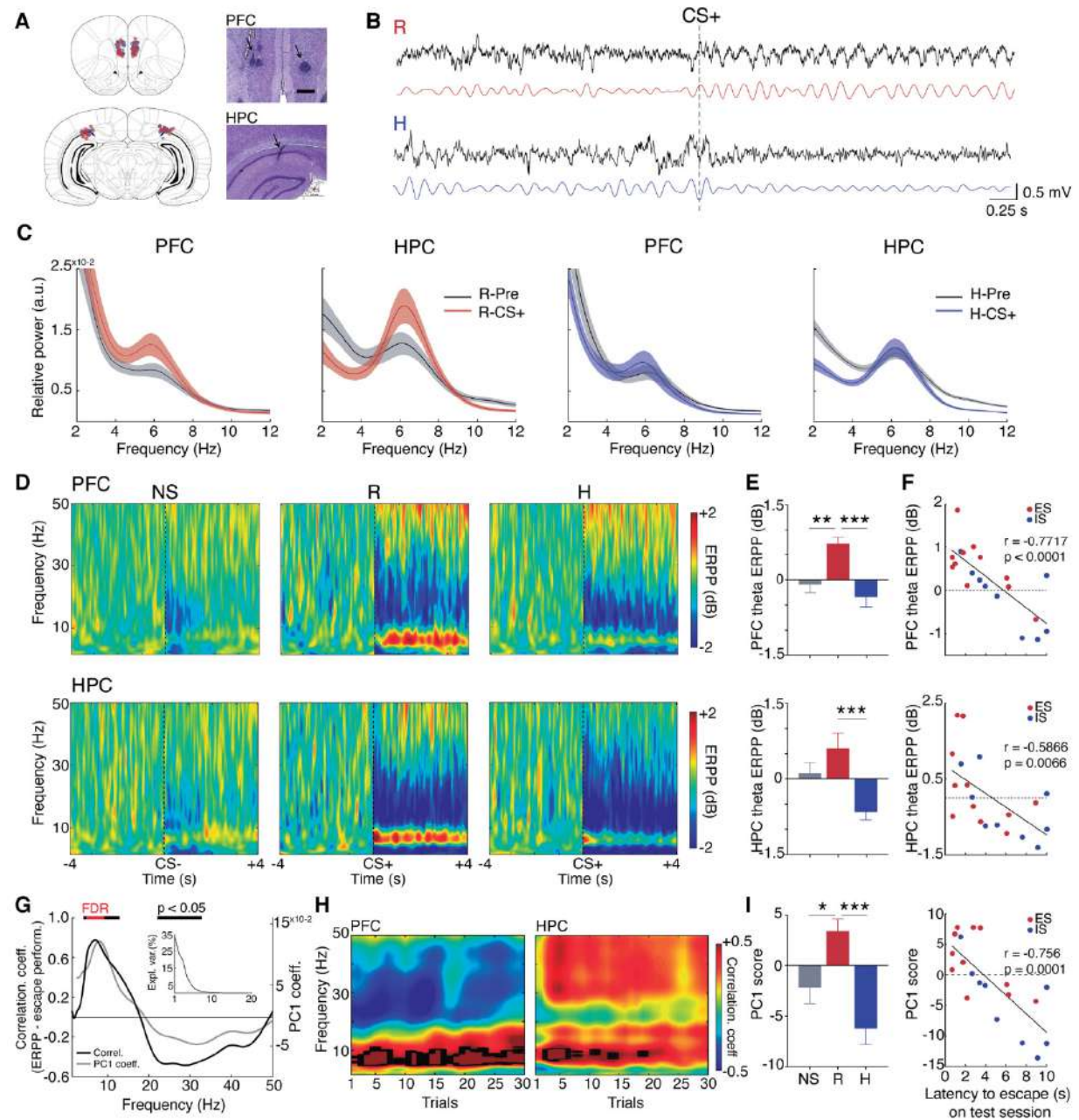
#### Data analysis

Signal processing and analysis of electrophysiological data were performed using custom scripts in MATLAB.

#### LFPs

LFP were epoched in two peristimulus windows: 8 s around CS onset (4 s pre-CS, 4 s post-CS onset), or 24-s periods encompassing CS and US (8 s pre-CS, 8 s during CS, 8 s after US). Post-US epochs, more specifically, always started 2 s after US offset. Signals were bandpass filtered (1–250 Hz), and epochs with locomotion were excluded based on power spectrum saturation and video inspection. Only epochs when animals expressed immobility were considered while excluding translocation (i.e., active avoidance attempts), pronounced head movements, rearing, and grooming. We chose to investigate locomotion-free epochs because some particular oscillatory activities are correlated with movement, representing a potential confounding factor in our results (Whishaw and Vanderwolf, 1973). Remaining epochs were then subtracted by the averaged epoch. Frequency bands were determined as  $\delta$  (1–4 Hz),  $\theta$  (5–10 Hz),  $\alpha/\beta$  (10–30 Hz), low  $\gamma$  (30–50 Hz), and high  $\gamma$  (80–110 Hz). For  $\theta$  bandpass filtering we used a broader band of 4–10 Hz (Buzsáki and Draguhn, 2004).

Power spectral density (PSD) was calculated using Welch’s method (1-s Hamming windowing, 90% overlap, 8192 points). Relative PSD was calculated by dividing the mean PSD estimates by the sum of the averaged pre-CS PSD below 50 Hz. We also investigated  $\theta$  power and peak frequency by concatenating all locomotion-free 1 s time windows with 90% overlap and calculating relative PSD to the sum of averaged pre-CS



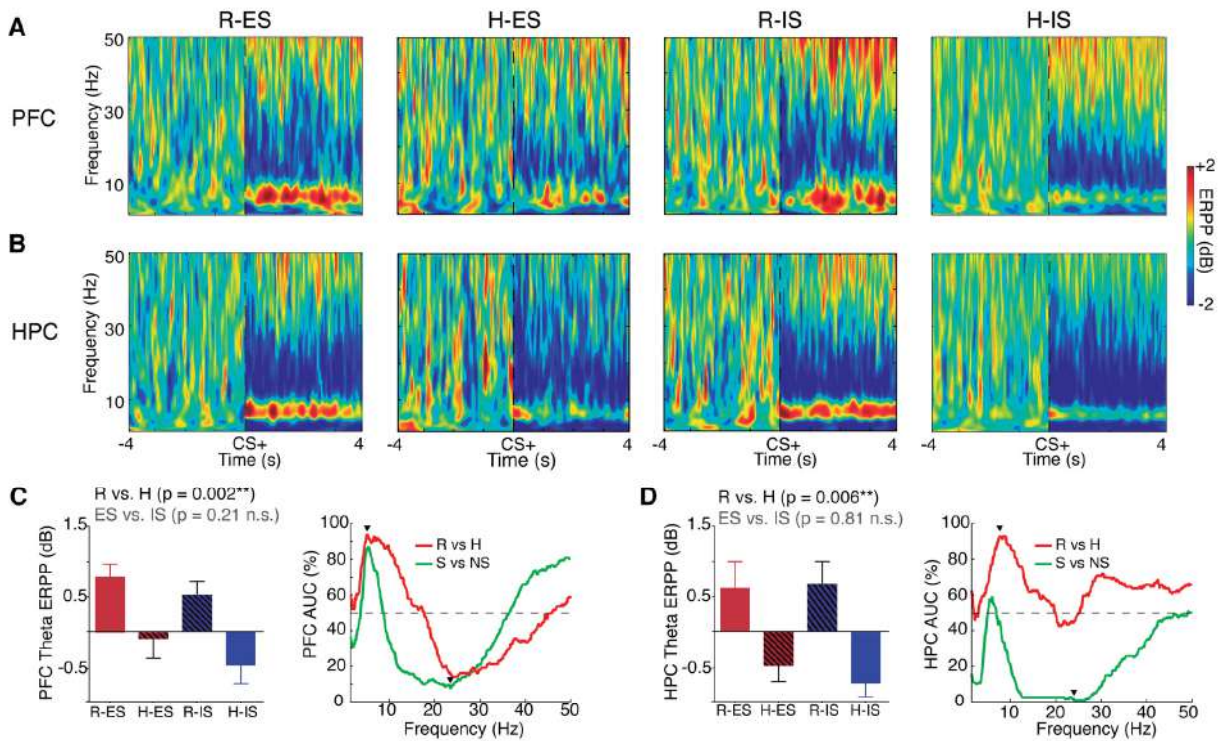
**Figure 2.** Differential engagement of  $\theta$  oscillations during the expectation of controllable and uncontrollable stress. **A**, Electrode placements in the prelimbic area of the PFC and intermediate HPC with representative electrolytic lesions. Gray = NS; red = ES; blue = IS. **B**, Representative traces of HPC LFPs (black) and  $\theta$ -filtered signals (colored) preceding controllable (top) and uncontrollable (bottom) shocks. **C**, PFC and HPC relative PSDs. **D**, Average spectrograms showing a unique distinction between R and H responses in the  $\theta$  band. **E**, Opposite CS<sup>+</sup>-related modulations of  $\theta$  power in R (increase) and H (decrease). **F**, PFC and HPC  $\theta$  power modulations in the first session correlate with later escape performance. **G**, The spectrum of correlations between PFC power modulation and escape performance reveals a similar pattern to the PFC power perturbation PC1 coefficients. Black lines =  $p < 0.05$ , Red line =  $p < \text{false discovery rate (FDR) corrected}$ . **H**, PFC presented strong correlations with escape performance throughout the test session. Black lines =  $p < \text{false discovery rate (FDR) corrected}$ . **I**, PC1 scores were significantly greater in R animals (left) and showed greater correlation with escape performance than each frequency separately (right); \* $p < 0.05$ , Fisher's LSD test. Here and on, shaded lines represent the mean  $\pm$  SEM.

PSD. Normalized PSD was obtained by the ratio in dB ( $10 \log_{10}$ ), with the averaged pre-CS PSD for each frequency bin. We detected power peaks within 5–10 Hz per time sample across stimuli.  $\theta$  Relative and normalized power (dB), and normalized peak frequency (% from the CS period) were compared.

Peristimulus time-frequency decomposition was calculated using complex Morlet wavelet convolution, with 3–20 linearly spaced cycles from 1 to 120 Hz. Full epoch dB single-trial correction was used, and the

mean event-related power perturbation (ERPP) was calculated using dB normalization against the pre-CS period, as described in Grandchamp and Delorme (2011). For event-related potentials (ERPs), intertrial coherence (ITC), and phase resetting analyses, data were not subtracted by trial averages. ERP was obtained by averaging LFP across trials. ITC was calculated as the mean resultant length (MRL) of phase differences for each time sample across trials using complex Morlet wavelet (as described above) for frequencies below 30 Hz. For comparisons, we used





**Figure 3.** Greater association between PFC and HPC network activities with future behavior (R vs H) than to programmed stress exposure (ES vs IS). **A, B**, Average spectrograms from all subgroups of (**A**) PFC and (**B**) HPC ERPP. **C, D**, PFC (**C**) and HPC (**D**)  $\theta$  ERPP average comparisons (left) and frequency-wise classification performance, estimated by the AUC-ROC (right). Arrows indicate the maximum AUC. Two-way ANOVA significances of behavioral outcome and exposure are reported at the top of panels **C, D**. S = stressed, n.s. = not significant.

$\theta$  ITC in the initial 300 ms after CS onset. For  $\theta$  phase resetting, we obtained the cosine of the linear interpolation between 0s and  $\pi$ s assigned to the peaks and valleys of the  $\theta$  bandpass filtered signals (adapted from Courtin et al., 2014). Then we calculated the intertrial variance of these amplitudes. We compared the mean intertrial variance across 0.1-s bins, and in the initial 150 ms after CS onset.

Cross-structural LFP synchrony, an indicative of functional connectivity, was estimated through phase coherence (Lachaux et al., 1999). Spectral mean phase coherence (MPC) was estimated by the MRL of phase differences between signals through Welch's method (same parameters of PSD analysis). Time-frequency decomposition was estimated by the multitaper method using five tapers with time-half bandwidth product of 3, in 1-s segments with 90% overlap. Time-frequency phase coherence perturbation was calculated as described for ERPP. Taking into account the possible nonlinearity of  $\theta$  oscillations, we also obtained the MRL of the differences between instant phases estimated through Hilbert transform of the  $\theta$  (4–10 Hz) bandpass filtered signals. For Wiener–Granger causality estimates in the frequency domain, we used the MVGC toolbox (Barnett and Seth, 2014). We used pairs of HPC and PFC LFPs after CS, excluding the initial 300 ms (to avoid nonstationarity of the ERPs). Unfiltered LFP was decimated to 200 Hz, and the model order was estimated by Akaike Information Criterion for each animal separately (model order range: 26–36). We fixed the model order of 36, resulting in an adequate frequency resolution for the slow oscillations predominating in our signals with reasonable computation cost. To estimate the lag between signals, we calculated the cross-correlation of  $\theta$  bandpass filtered signals and located the time of correlation peaks. With this we obtained both the distribution of lags and average cross-correlation coefficients.

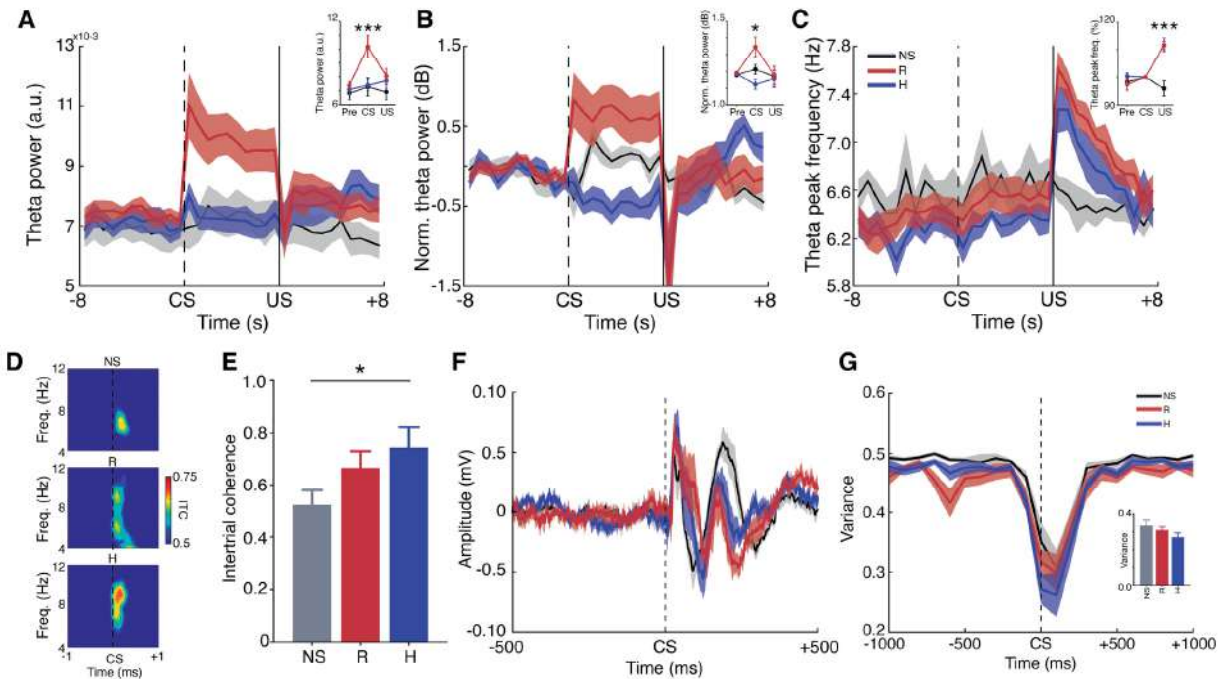
Cross-frequency phase-amplitude coupling indicates how the phases of slower oscillations modulate the amplitude of fast oscillations (Tort et al., 2008, 2009; Ruggiero et al., 2018). We estimated phase-amplitude coupling strength across pairs of frequencies by computing the

modulation index (MI; as described by Tort et al., 2010). Comodulation maps were constructed for frequency band pairs varying: (1) from 1 to 50 Hz (0.5-Hz bins) in steps of 1 Hz for phase modulating; and (2) from 10 to 120 Hz (1-Hz bins) in steps of 5 Hz for amplitude modulated. MI between  $\theta$  band (4–10 Hz) and high  $\gamma$  band (80–110 Hz) were then obtained for statistical comparisons. We concatenated and used all locomotion-free pre-CS and CS periods (5 s) rather than the entire epochs because we did not see evidence for CS-related MI perturbation.

#### Single-unit activity

Spikes were sorted semi-automatically (Offline Sorter, Plexon) by using principal component analysis (PCA) of spike waveforms, visualization of basic features (amplitude, rate, interspike intervals), and annotations from presorting observations. Sort quality was estimated by the Davies–Bouldin index (DB; range: 0.07–0.47) and J3 value (range: 0.03–4.46) of the three first principal components. We only included channels/units following the criteria: DB < 0.5; multivariate ANOVA  $F > 3$  and  $p < 0.05$ ; Dunn index > 1; isolation distance > 30. Individual neurons recorded by more than one channel were identified via cross-correlation (NeuroExplorer, Nex Technologies), and in such cases, only the spike train with the largest waveforms were included in the analysis. The samples of single units (NS: 21, R-ES: 33, H-IS: 35, H-ES: 7, R-IS: 14) were then analyzed in 30-s peristimulus epochs: 10 s pre-CS, 10 s during CS, and 10 s after US offset (similarly to LFP epoching).

Neurons were labeled as modulated or nonmodulated based on stimulus reactivity through comparing pre-CS spike counts versus during-CS and post-US spike counts via one-tailed paired  $t$  tests. Modulated neurons were then classified as excited (higher spike count) or suppressed (lower spike count) by each stimulus (CS or US; Wood et al., 2012; Bueno-Junior et al., 2017, 2018). The  $p$  value of this categorization was Bonferroni corrected based on the total number of neurons from all groups ( $N = 110$ ,  $p = 0.0004$ ). Firing rate modulation was estimated for each neuron by Z-score normalization against the pre-CS period in bins of 100 ms. The same bin size was used for peristimulus time histograms.



**Figure 4.** The sustained engagement of  $\theta$  activity during the anticipation of aversive stimuli is associated with controllability. **A–C**, Hippocampal  $\theta$  power and frequency map states of anticipation, reaction, and controllability over aversive stimuli. **A**, **R** presented stronger  $\theta$  power only during CS<sup>+</sup>. **B**, Degree of control over stress bidirectionally influenced  $\theta$  power modulation during CS<sup>+</sup>. **C**, Increases in  $\theta$  peak frequency after US were not modulated by the degree of control. Also note that CS<sup>+</sup> did not modulate  $\theta$  frequency. **A–C** insets compare the averages of 4–5 periods before CS (pre), after CS onset (CS), and 2 s after shock termination (US). **D–G**, Greater CS-evoked PFC  $\theta$  phase resetting in helplessness. **D**, Average spectrograms of ITC. **E**, Greater intertrial  $\theta$  coherence in H than NS in the initial 300 ms. **F**, Average ERPs were consistent with  $\theta$  cycles. **G**, Variance of the standardized  $\theta$  amplitudes showing a CS-triggered decrease in variance in all groups, especially in helpless animals. Bottom right panel compares mean variances in the initial 150 ms (i.e., one  $\theta$  cycle). ITC = intertrial coherence; \* $p$  < 0.05, Fisher's LSD test.

We used the mean Z-score of the initial 1 s after CS onset and initial 1 s after US offset for group comparison.

We then explored more deeply the relationships between CS-evoked and US-evoked responses across neurons. First, all binned Z-scores during CS and post-US (i.e., their entire 10 s) were separately summed up, generating one CS and one US modulation value per neuron. Then, we calculated: (1) net difference as the difference between US and CS values, (2) absolute difference as the modulus of the difference between US and CS values, and (3) relative difference as the difference between the moduli of US and CS values. To identify temporal patterns of neuronal modulation in behavioral categories (stressed, R, and H), we used PCA. PC1 coefficients were obtained from mean Z-scores per bin of all neurons. For each behavioral category, we calculated correlation coefficient moduli between Z-scored firing rate for each neuron and PC1 coefficients. This procedure is based on a previously described method (Chapin and Nicolelis, 1999; Narayanan and Laubach, 2009; Kim et al., 2017), with one adaptation: we replaced the PC1 strength (modulus of the sum of PC1 coefficients projected onto the Z-scored data) by the correlation coefficient, as we observed this coefficient to correspond better to patterns than intensity of modulation.

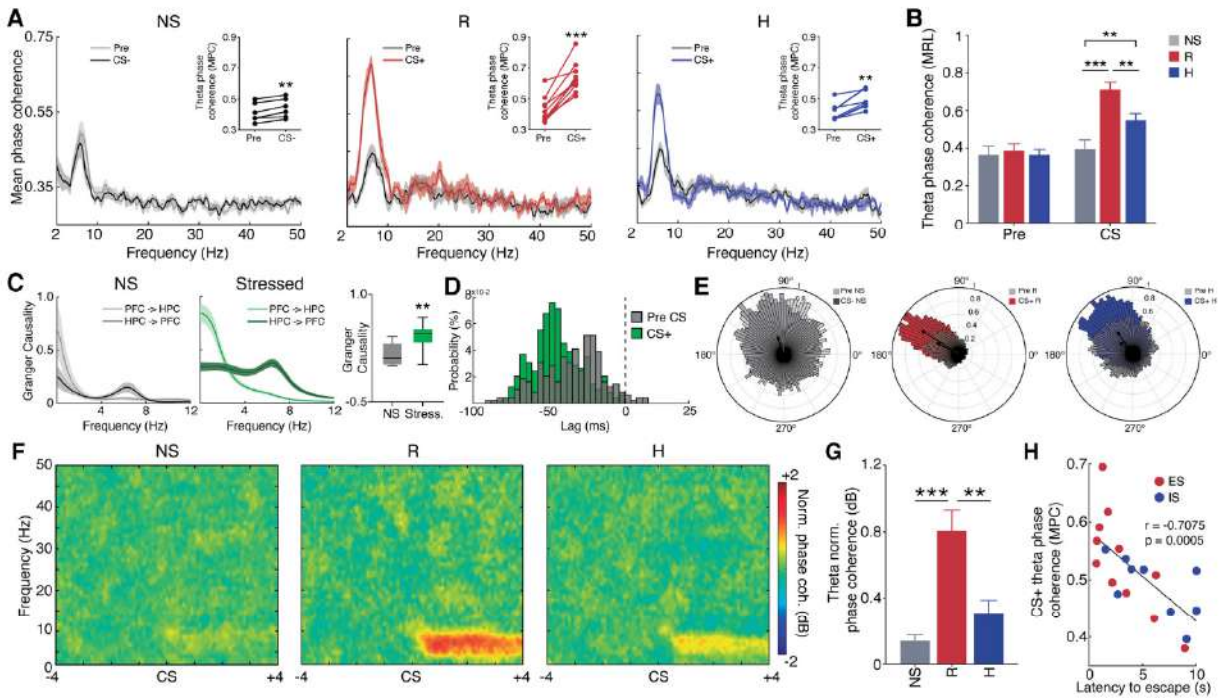
We also investigated the phase locking of single-unit activity to  $\theta$  oscillations. Spike times were rounded to the LFP sampling rate (1 kHz),  $\theta$  phases were assigned to each spike, and their phase locking strength was estimated by pairwise phase consistency (PPC). PPC was calculated as described by Vinck et al. (2010) using the FieldTrip toolbox (Oostenveld et al., 2011). PPC computes the mean of the cosine of the absolute angular distance for all possible pairs of spike phases. This measure is unbiased by the variable number of spikes. Negative values were corrected to zero. The significance of phase-locking was calculated using Rayleigh's Z test (Berens, 2015) with a  $p$  value threshold of 0.01, and the Z parameter ( $Z = \text{MRL} \times \text{number of spikes}^2$ ) logarithm was computed. Only neurons with >50 spikes during CS in locomotion-

free trials were analyzed (as described in Karalis et al., 2016). Spike-triggered average (STA) PSD was determined as the PSD of the averaged LFP across 1-s segments centered at each spike per neuron (adapted from Yang et al., 2018). Firing rhythmicity was assessed by computing spectral estimates on binarized spike data (fire = 1, no fire = 0; similarly to Rosenberg et al., 1989; Royer et al., 2010). Relative STA-PSD, spike PSD, and time-frequency decomposition were computed within 1.5–30 Hz using 1024 points. Windowing parameters were the same as used for LFP analysis.

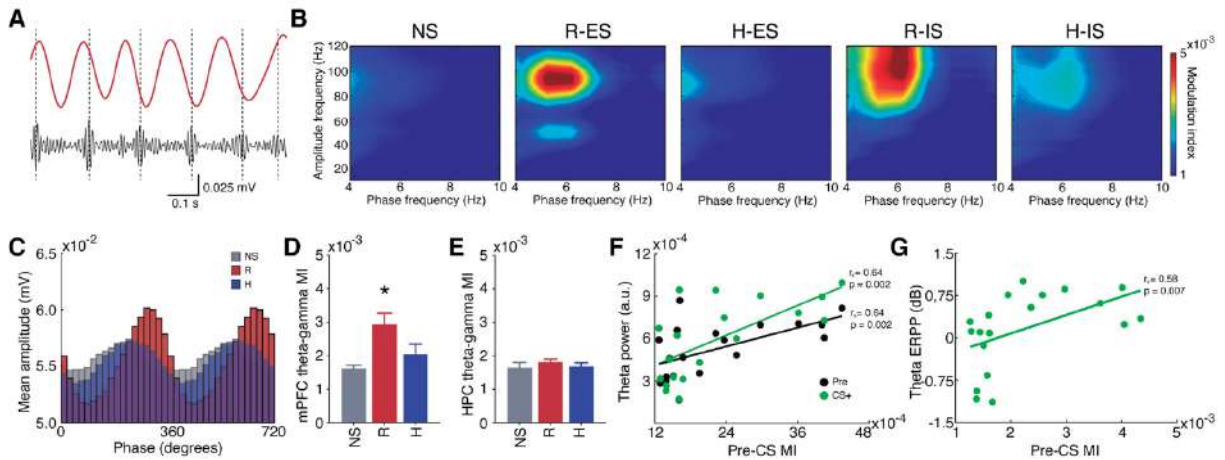
#### Multivariate analysis and classification model

To estimate the classification accuracy of behavioral categories by single electrophysiological variables we calculated the area under the receiver operating characteristic curve (AUC-ROC). We explored collective patterns of relationships among electrophysiological data through unsupervised multivariate analysis. Each variable was Z-scored before multivariate analysis, except for power spectra or binned firing rates. PCA was computed using singular value decomposition algorithm, and PC scores were obtained through the projection (i.e., sum of the pointwise multiplication) of PC coefficients onto the original Z-scored data. Common factor analysis was computed using maximum likelihood estimates to obtain factor loadings. Factor scores were in turn obtained by projecting the factor loadings, as described for PCA. Agglomerative hierarchical tree clustering was computed using inner squared Euclidean distance (dissimilarity) and clusters were determined by threshold values of dissimilarity.

To assess the effectiveness of neurophysiological variables to simultaneously classify all stressor controllability-related categories, NS, R, and H, we fitted a regularized linear discriminant classifier model and estimated the classification accuracy. For that, we used the MATLAB function *fitcdiscr* with  $\gamma$  hyperparameter optimization. We deliberately used only two predictors to allow 2D graphical representation and interpretation of model functions. Classification



**Figure 5.** Enhanced HPC to PFC  $\theta$  synchrony during stress correlates with learned resistance. **A**, MPC spectra showing a specific modulation of  $\theta$  band by  $CS^+$ . **B**, Greater  $\theta$  MRL during  $CS^+$ , particularly stronger in R. There were no differences in the pre- $CS$  period. **C**, Granger causality shows a stronger HPC to PFC  $\theta$  directionality during  $CS^+$ . **D**, Distribution of lags of cross-correlation coefficient peaks for all trials ( $N = 489$ ). HPC  $\theta$  consistently preceded (negative values) the PFC in  $\sim 49$  ms. **E**, Representative polar histogram of HPC to PFC  $\theta$  phase differences. Vector sizes indicate the MRL. **F**, Average spectrograms of event-related phase coherence perturbation. **G**, R presented significantly greater phase coherence perturbation. **H**,  $\theta$  MPC during  $CS^+$  presented a strong correlation with later escape performance.



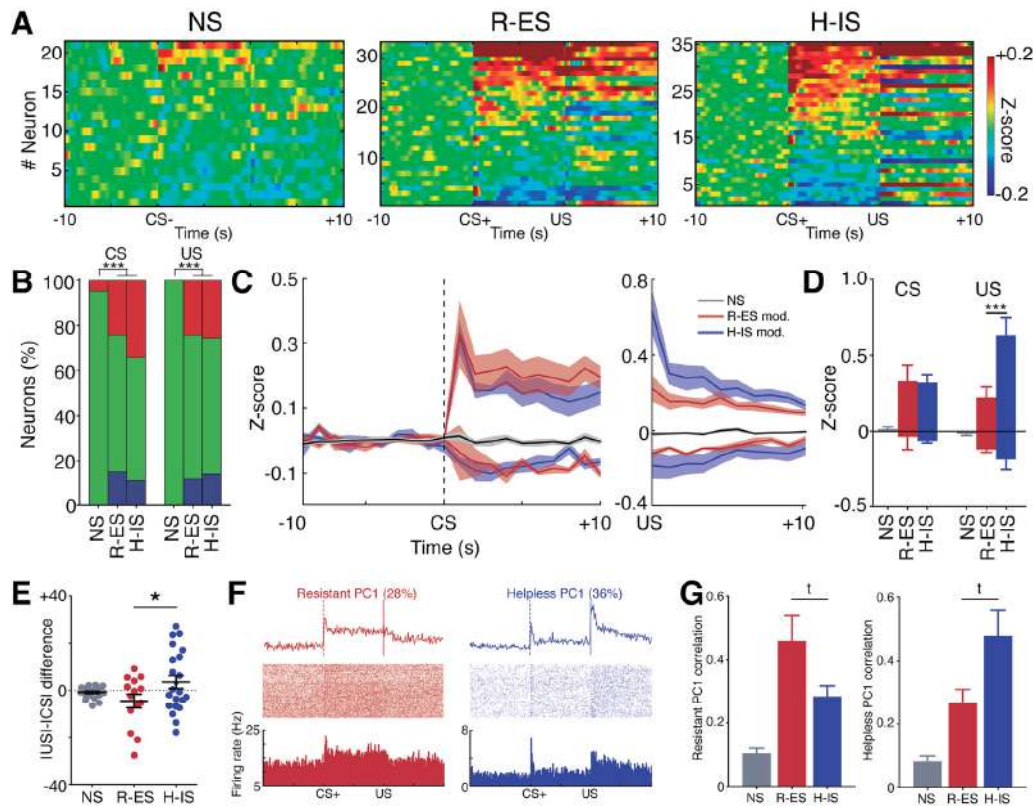
**Figure 6.** Prestimulus  $\theta$ - $\gamma$  phase-amplitude coupling in the PFC is associated with stress resistance and  $\theta$  power modulation. **A**, Representative traces of PFC  $\theta$  (red) and high  $\gamma$  (black) filtered signals. **B**, PFC phase-amplitude comodulation maps showing blobs of  $\theta$ -high  $\gamma$  phase-amplitude coupling in R animals from both ES and IS. **C**,  $\theta$  phase and high  $\gamma$  amplitude histograms showing stronger coupling in R. **D**, **E**, The association between  $\theta$ - $\gamma$  coupling and stress resistance was specific to the PFC. **D**, R presented greater MI than both NS and H. **F**, **G**, PFC pre- $CS^+$  MI showed **F** a stronger correlation with  $CS^+$   $\theta$  power (green) than pre- $CS^+$   $\theta$  power (black) and **G** also correlated with  $CS^+$   $\theta$  power perturbation (Spearman's correlation).

accuracy was finally determined as the probability of correct category assignments considering all animals, and then through leave-one-out cross-validation.

**Statistical analyses**

We used paired  $t$  tests for within-group comparisons, one-way ANOVA for comparisons between three or more groups, and two-way ANOVA

with repeated measures for comparisons across time bins, or periods. We used two-way ANOVA to compare the effects of behavior (R vs H) and stress exposure (ES vs IS) across subsamples. We performed Fisher's least significant difference (LSD) test as *post hoc* analysis after ANOVA. Normality was assessed using the Lilliefors test. When at least one group in a given comparison failed the normality test, we used nonparametric alternatives: Wilcoxon signed-rank test for peristimulus changes, and Kruskal–Wallis test to compare three or more groups, followed by the



**Figure 7.** Differential neuronal firing responses to  $CS^+$  and US is associated with controllability or helplessness. **A**, Firing rate modulation by CS and US. Neurons ( $y$ -axes) are ordered by CS modulation. There are clear distinctions between NS versus both stressed groups but no clear distinction between R-ES and H-IS. **B**, Both stressed groups presented more CS-modulated and US-modulated neurons than NS, but no difference was found between R-ES and H-IS. **C**, **D**, Firing rate modulation (mean  $\pm$  SEM) across neuronal categories. **E**, Bidirectional influence of the degree of control over US- $CS^+$  differences. R-ES modulated units showed greater responses to  $CS^+$  than US, while H-IS showed the opposite effect. **F**, PC1 coefficients for all R neurons (left) and H neurons (right) with raster plots from representative neurons corresponding to each pattern. **G**, Average correlation of modulated neurons with the resistant PC1 and the helpless PC1.  $^{\dagger}p < 0.1$ .

pairwise Wilcoxon rank-sum *post hoc* test. The  $\chi^2$  test was used to compare the proportions of observations (i.e., rats or units) between groups. We calculated Pearson's correlation between normal distributions and Spearman's rank correlation as a nonparametric equivalent. For correlation analysis across trials, we used the false discovery rate correction by the number of trials ( $N = 30$ ). We applied Fisher's Z transform to compare coherence and correlation estimates. Possible outlier subjects were examined using Tukey's fences with three times the lower-to-upper quartile range and, when detected, were excluded from further analysis (one rat was excluded for PFC MI comparisons). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. The significance level was set to 0.05 unless stated otherwise. Significances are expressed as  $^{\dagger}p < 0.1$ ,  $^*p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ , and  $^{***}p < 0.001$ .

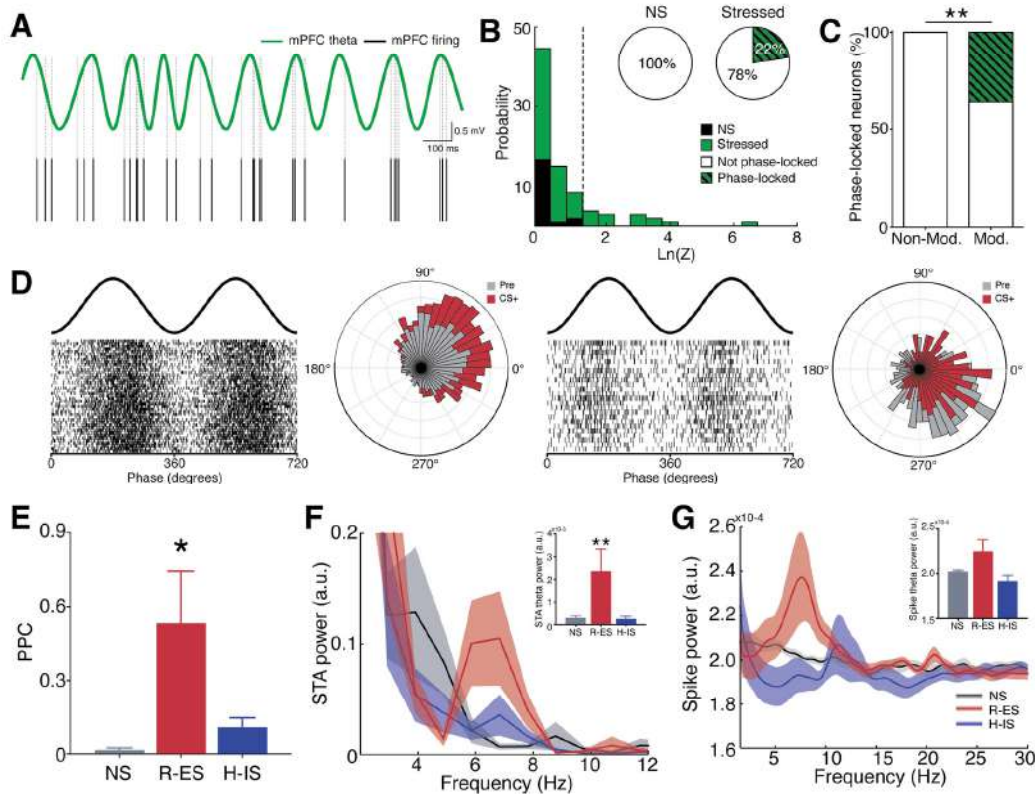
## Results

### Differential engagement of $\theta$ oscillations during the expectation of controllable and uncontrollable stress

To identify HPC and PFC neural correlates of stressor controllability and uncontrollability, we submitted rats to controllable ES, uncontrollable IS or NS (Fig. 1A; see Materials and Methods). Initially, we confirmed that all ES animals ( $N = 11$ ) learned the escape response on day 1 (Fig. 1B). To evaluate whether this initial exposure would generate resistance to future uncontrollable stressors, we exposed both ES and IS animals to IS on day 2 and measured the escape performance of all animals on day 3 (the test session; Fig. 1A). Our results show that both the mean latency to escape and

the number of failures were equivalent between ES and NS ( $N = 7$ ), but greater in IS ( $N = 9$ ) than ES (latency: one-way ANOVA  $F_{(2,24)} = 4.77$ ,  $p = 0.01$ ; *post hoc* Fisher's LSD test: ES vs NS:  $t_{(24)} = 0.95$ ,  $p = 0.36$ ; ES vs IS:  $t_{(24)} = 2.28$ ,  $p = 0.03$ ; failures: Kruskal-Wallis  $H_{(3)} = 7.41$ ,  $p = 0.02$ ; *post hoc* Wilcoxon rank-sum test: ES vs NS:  $U = 33$ ,  $p = 0.62$ ; ES vs IS:  $U = 22$ ,  $p = 0.03$ ; Fig. 1C). This observation confirms the role of controllability in mediating resistance. We then categorized R versus H individuals through cluster analysis based on the similarity with NS behavior (Fig. 1D). Previous exposure to ES generated a greater proportion of R individuals (72%,  $N = 8/11$ ) not significantly different from NS [ $\chi^2(1, N = 18) = 2.29$ ,  $p = 0.13$ ], while IS generated a greater proportion of H individuals (66%,  $N = 6/9$ ) significantly different from NS [ $\chi^2(1, N = 16) = 7.46$ ,  $p = 0.006$ ; Fig. 1E]. Notoriously, R and H animals showed clearly distinct behavioral profiles in the test session (latency:  $F_{(4,22)} = 18$ ,  $p < 0.0001$ ; number of failures:  $H_{(5)} = 18.57$ ,  $p = 0.001$ ; Fig. 1F,G). Once we confirmed that the degree of control experienced over stressors was the main factor influencing future escape performance and the emergence of R versus H profiles, we sought to investigate the neural predictors of R and H animals.

We found significant effects of stressor controllability in  $CS^+$  ERPP that were exclusive to the  $\theta$  band (5–10 Hz) in both PFC ( $F_{(2,24)} = 12.23$ ,  $p = 0.0002$ ; *post hoc*: R vs H:  $t_{(24)} = 4.71$ ,  $p < 0.0001$ ) and HPC ( $F_{(2,23)} = 7.80$ ,  $p = 0.002$ ; *post hoc*: R vs H:  $t_{(23)} = 3.94$ ,  $p = 0.0006$ ; Fig. 2). Moreover, the  $CS^+$  modulations of  $\theta$  power were the opposite between R and H groups: while R animals



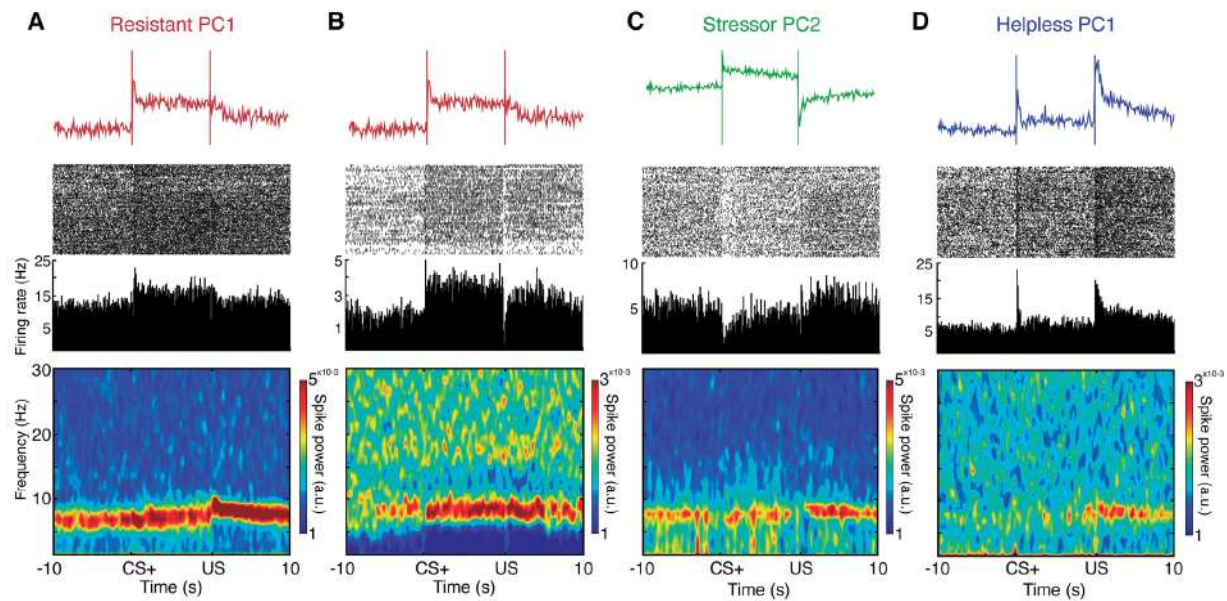
**Figure 8.** PFC neurons modulated under controllable stress are coupled with  $\theta$  phase and rhythm. **A**, Representative PFC  $\theta$ -filtered signal with a neuron exhibiting phase-locked spikes. **B**, Distribution of Rayleigh's Z parameter logarithm. Graded lines indicate the neurons considered significantly phase-locked. Pie charts show greater proportion of phase-locked neurons during stress (right) than NS (left). **C**, Greater proportion of phase-locked neurons from modulated units compared with nonmodulated units. **D**, Representative phase raster plots and polar histograms of two neurons from R-ES animals showing distinct modulations by  $CS^+$  and strong  $\theta$  phase-locking to different phases. **E**, R-ES modulated neurons present stronger PPC. **F**, Stronger spike-triggered averaged LFP  $\theta$  power in R-ES modulated neurons. **G**, Spike relative PSD showing prominent  $\theta$  power in R-ES modulated neurons, indicating  $\theta$  rhythmicity of these neurons. However, we found no statistical significance between averages.

presented a mean increase of  $\theta$  power (PFC:  $0.73 \pm 0.14$  dB; HPC:  $0.62 \pm 0.29$  dB), H animals exhibited a decrease (PFC:  $-0.35 \pm 0.20$  dB; HPC:  $-0.66 \pm 0.14$  dB; Fig. 2D–F). Remarkably, R-ES and R-IS subgroups exhibited the same distinction against H-IS and H-ES (Fig. 3). In fact, we found that the behavioral outcome (R vs H) rather than the programmed stress exposure (ES vs IS) was the most significant factor influencing  $\theta$  ERPP (two-way ANOVA, PFC: behavior  $F_{(1,16)} = 13.01$ ,  $p = 0.0024$ ; exposure  $F_{(1,16)} = 1.68$ ,  $p = 0.21$ ; HPC: behavior  $F_{(1,16)} = 9.81$ ,  $p = 0.0064$ ; exposure  $F_{(1,16)} = 0.05$ ,  $p = 0.81$ ; Fig. 3C,D). Furthermore, we found a negative correlation between  $\theta$  ERPP on day 1 and latency to escape in the test session (day 3) across all stressed animals in both brain regions. This correlation was strong in the PFC ( $r_{(18)} = -0.77$ ,  $p < 0.0001$ ) and moderate in the HPC ( $r_{(18)} = -0.58$ ,  $p = 0.006$ ; Fig. 2F). In addition to confirming the strong correlations with escape performance, across the whole PFC spectrum, in the  $\theta$  range (Fig. 2G), we observed that PFC  $\theta$  ERPP was correlated to escape performance throughout the entire test session, while in the HPC, it was confined to the initial trials (Fig. 2H).

As we also noticed weaker correlations with behavior in other frequencies beyond  $\theta$ , we investigated whether the whole-spectrum of PFC power modulations during stress could be collectively associated with resistance or helplessness through PCA. Surprisingly, the PC1 coefficients (Fig. 2G), which collectively account for the maximum data variance (35% explained

variance; see inset of Fig. 2G), showed the same pattern as the spectrum of correlations with escape performance (Fig. 2G). Additionally, PC1 scores were significantly greater in R animals ( $F_{(2,24)} = 12.57$ ,  $p = 0.0002$ ; R vs H  $t_{(24)} = 4.97$ ,  $p < 0.0001$ ; R vs NS ( $t_{(24)} = 2.68$ ,  $p = 0.01$ ; H vs NS  $t_{(24)} = 1.85$ ,  $p = 0.07$ ), and they showed stronger correlation with subsecond escape latency ( $r_{(18)} = -0.75$ ,  $p = 0.0001$ ; Fig. 2I) than any frequency separately (Fig. 2G).

Aside from the relationship between  $\theta$  and controllability, we observed that  $CS^+$  profoundly decreased power in  $\delta$  and  $\alpha/\beta$  bands (1–30 Hz), regardless of the degree of control. We inspected the discrimination accuracy of all stressed animals (R plus H) against NS by the ERPP for each frequency and found the maximum distinction at the upper limits of  $\beta$  range (HPC: AUC = 0.99 at 24.04 Hz; PFC: AUC = 0.92 at 23.43 Hz; Fig. 3C,D, right panels). Also, the association between stimulus-triggered HPC  $\theta$  power and stress control selectively occurred during  $CS^+$  (theta power: two-way ANOVA period  $\times$  stressor controllability interaction:  $F_{(4,69)} = 2.21$ ,  $p = 0.07$ ;  $CS$  post hoc: R vs. NS:  $t_{(69)} = 3.50$ ,  $p = 0.0008$ ; H vs. NS:  $t_{(69)} = 0.14$ ,  $p = 0.88$ ; R vs. H:  $t_{(69)} = 3.78$ ,  $p = 0.003$ ;  $\theta$  power dB from pre- $CS$ : two-way ANOVA period  $\times$  stressor controllability interaction:  $F_{(4,69)} = 2.63$ ,  $p = 0.04$ ;  $CS$  post hoc: R vs H:  $t_{(69)} = 4.17$ ,  $p < 0.0001$ ; Fig. 4A,B), while the periods following the interruption of the USs (footshocks) were marked by transient increases in  $\theta$  peak frequency, not power, regardless of their controllability ( $\theta$  peak % from  $CS$ : two-way ANOVA period  $\times$  stressor



**Figure 9.** Representative neurons exhibiting the concurrence of stressor controllability-related firing patterns and  $\theta$  rhythm. **A–D**, Representative neurons displaying perievent firing rate responses (medium) consistent with the previously described patterns revealed through PCA (top), and evident spiking  $\theta$  power (bottom). These neurons indicate that neuronal representations of stressor controllability are coupled with  $\theta$  rhythm. **A–C**, R-ES neurons consistent with (**A**, **B**) resistant PC1 and (**C**) stressor PC2. Note the increases in spiking  $\theta$  power parallel to decreases in firing rate after US. **D**, H-HS neuron consistent with helpless PC1. Note the weaker spiking  $\theta$  power during CS<sup>+</sup>.

controllability interaction:  $F_{(4,69)} = 19.44$ ,  $p < 0.0001$ ; US *post hoc*: R vs NS:  $t_{(66)} = 6.80$ ,  $p < 0.0001$ ; H vs NS:  $t_{(66)} = 6.63$ ,  $p < 0.0001$ ; R vs H:  $t_{(66)} = 0.09$ ,  $p = 0.92$ ; theta power: US *post hoc*: R vs NS:  $t_{(69)} = 1.35$ ,  $p = 0.18$ ; H vs NS:  $t_{(69)} = 0.92$ ,  $p = 0.35$ ; R vs H:  $t_{(69)} = 0.43$ ,  $p = 0.66$ ;  $\theta$  power dB from pre-CS: US *post hoc*: R vs H:  $t_{(69)} = 0.39$ ,  $p = 0.69$ ; Fig. 4C). The elevations of HPC  $\theta$  frequency after US (% from CS) were also shown to be a robust discriminator of stressed animals (AUC=0.97). Although we found a suppression of PFC  $\theta$  power during CS<sup>+</sup> associated with helplessness, H exhibited stronger  $\theta$  phase resetting to CS<sup>+</sup> onset than NS (ITC ANOVA:  $F_{(2,24)} = 2.27$ ,  $p = 0.12$ ; *post hoc*: H vs NS:  $t_{(24)} = 2.11$ ,  $p = 0.04$ ; Fig. 4D–G).

Our results reveal an unprecedented association between both HPC and, especially, PFC  $\theta$  power and stressor controllability. We found that the sustained engagement of  $\theta$  power during the anticipation of aversive stimuli depends on the expectation of control and that this activity is related to the acquisition of long-term resistance to future stressors, as demonstrated by persistent active coping and the preserved ability of escape learning.

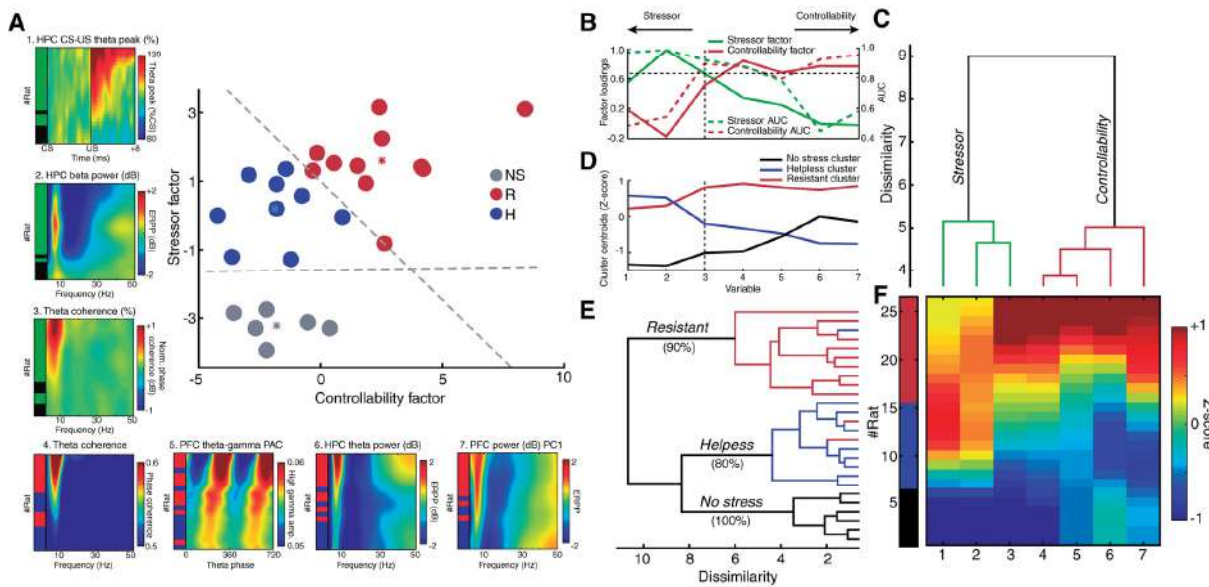
#### Enhanced HPC to PFC $\theta$ synchrony during stress correlates with learned resistance

To infer the functional connectivity between HPC and PFC, we calculated their phase coherence. The MPC spectra revealed an increase within the  $\theta$  band during CS<sup>+</sup> in both R and H but not NS animals (Fig. 5A). This effect was observed to be consistent across all R and H subjects (Fig. 5A, insets) and MPC change to CS (% to pre-CS) revealed to be a robust discriminator of all stressed animals (AUC=0.92). We also show that although  $\theta$  MRL did not differ between groups during the pre-CS period, it was significantly modulated by both CS<sup>+</sup> and the expected degree of control (two-way ANOVA stressor controllability  $\times$  period interaction  $F_{(2,23)} = 21.85$ ,  $p < 0.0001$ ; Fig. 5B). We found that  $\theta$  MRL in both R and H were greater than NS ( $t_{(46)} = 5.93$ ,

$p < 0.0001$ ;  $t_{(46)} = 2.76$ ,  $p = 0.008$ ), and this effect was even greater in R than H ( $t_{(46)} = 3.45$ ,  $p = 0.001$ ; Fig. 5B). The directionality of  $\theta$  LFP between regions was investigated through Granger causality analysis, which showed a prominent one-way directionality from the HPC to PFC in the  $\theta$  range during CS<sup>+</sup> ( $t_{(26)} = 3.55$ ,  $p = 0.001$ ; Fig. 5C). We also examined the time delay between regions, and we showed that HPC  $\theta$  signals constantly led the PFC by 49 ms during stress (maximum average cross-correlation: 49.00 ms; peak of lag distribution:  $50.44 \pm 3.56$  ms; Fig. 5D,E). Moreover, we estimated time-frequency CS<sup>+</sup>-related modulation of phase coherence, and we found a stronger HPC-PFC synchronization in R than H ( $F_{(2,23)} = 12.03$ ,  $p = 0.0003$ ;  $t_{(23)} = 3.72$ ,  $p = 0.001$ ; Fig. 5F,G). Also, similarly to the findings on  $\theta$  power, we also observed that CS<sup>+</sup>  $\theta$  MPC and its modulation were more associated with behavior than exposure (two-way ANOVA: MPC: behavior  $F_{(1,16)} = 6.75$ ,  $p = 0.01$ ; exposure  $F_{(1,16)} = 0.28$ ,  $p = 0.59$ ; normalized coherence: behavior ( $F_{(1,16)} = 7.80$ ,  $p = 0.01$ ; exposure  $F_{(1,16)} = 0.09$ ,  $p = 0.76$ ). Finally, HPC-PFC  $\theta$  MPC during CS<sup>+</sup> was strongly correlated with the mean escape latency in the test session ( $r_{(18)} = -0.70$ ,  $p = 0.0005$ ; Fig. 5H). In addition to corroborating previous reports that HPC  $\theta$  synchronizes with the PFC during the anticipation of aversive stimuli (Lesting et al., 2011), these results demonstrate that the strength of this synchronization is associated with controllability and learned resistance.

#### Prestimulus $\theta$ - $\gamma$ phase-amplitude coupling in the PFC is associated with stress resistance and $\theta$ power modulation

The findings reported so far show that the network activity during CS<sup>+</sup> is highly associated with the expected degree of control over upcoming aversive stimuli. However, especially in the pre-CS period we observed a distinctively strong  $\theta$ - $\gamma$  phase-amplitude coupling (Fig. 6A) in R individuals. From the comodulation maps shown in Figure 6B, we observed that phase-amplitude coupling was specific to  $\theta$  phases (4–10 Hz) and high  $\gamma$  (80–



**Figure 10.** PFC and HPC network activities discriminate individuals under stress and predict resistance. **A**, A linear model accurately discriminated individuals under stress and predicted resistance. **A1–A7**, Electrophysiological variables used in the model: (1) change in US  $\theta$  peak frequency (% from CS); (2) decrease in HPC  $\beta$  (24 Hz) power; (3) change in  $\theta$  MPC (% from pre-CS); (4)  $\theta$  MPC during CS; (5) PFC  $\theta$ -high  $\gamma$  phase-amplitude coupling (MI); (6) HPC  $\theta$  (7.7 Hz) power perturbation; (7) PFC spectral power perturbation PC1 score. The left bars indicate stressed (green) versus NS (black) individuals discriminated for variables 1–3, and R (red) versus H (blue) for variables 4–7. Dashed lines are the functions of the regularized linear discriminant classifier model. **B**, Stressor and controllability are two dissociable factors influencing HPC-PFC network activity. Factor analysis for two factors returned factor loadings (solid lines) that weighted specifically on controllability-related variables (factor 1: controllability factor) or stressor-related variables (factor 2: stressor factor). Note the resemblance to the classification accuracy (AUC, dashed lines) of each variable for R versus H (red line) and S (stress group as the union of R and H) versus NS (green line). **C**, Hierarchical clustering revealed that stressor-related (1–3) and controllability-related (4–7) variables were indeed dissociable. **D**, **E**, Hierarchical clustering revealed three distinctive clusters with specific (**D**) patterns of activity (cluster centroids) that (**E**) predominantly comprised individuals from each behavioral category. **F**, Standardized values (smoothed Z-score) of each electrophysiological variable used in the model. Subjects were organized in NS, H, and R and were ordered by the sum of all effects.

110 Hz) amplitudes (Fig. 6B,C). PFC pre-CS MI was more effective in discriminating R from H individuals ( $H_{(2)} = 7.92$ ,  $p = 0.01$ ; R vs H:  $U = 20$ ,  $p = 0.04$ ; AUC = 0.77; Fig. 6D) than during the CS period (AUC = 0.61) and showed a significant association with behavior but not with exposure (two-way ANOVA: behavior  $F_{(1,15)} = 5.00$ ,  $p = 0.04$ ; exposure  $F_{(1,15)} = 1.58$ ,  $p = 0.22$ ). We excluded one R subject from these comparisons because of much higher PFC MI values than the other subjects. Conversely, HPC  $\theta$ -high  $\gamma$  coupling was not associated with either stress or behavior (HPC pre-CS MI one-way ANOVA  $F_{(2,23)} = 0.58$ ,  $p = 0.56$ ; Fig. 6E). Consistently with previous studies (Tort et al., 2008), we found a correlation between  $\theta$ - $\gamma$  MI and  $\theta$  power before CS<sup>+</sup> ( $r_{s(17)} = 0.64$ ,  $p = 0.002$ ), however, pre-CS MI was also correlated with CS<sup>+</sup>  $\theta$  power ( $r_{s(17)} = 0.64$ ,  $p = 0.002$ ; Fig. 6F). Additionally, pre-CS MI also correlated with  $\theta$  ERPP ( $r_{s(17)} = 0.58$ ,  $p = 0.007$ ; Fig. 6G). These findings indicate that basal  $\theta$ - $\gamma$  MI in the PFC is associated with stress resistance and controllability-related activity.

#### Differential neuronal firing responses to CS<sup>+</sup> and US is associated with controllability or helplessness

Previous studies have shown that PFC inhibition abolishes the protective effects of stressor controllability (Amat et al., 2005, 2006). Moreover, prelimbic neurons were reported to exhibit greater excitability *in vitro* after escapable but not inescapable stress (Varela et al., 2012). Maier and colleagues hypothesized that PFC activity would be excited under controllable stress, and either suppressed or not active under uncontrollable stress (Maier et al., 2006; Maier, 2015). We recorded PFC neuronal activity around ES and IS and we found no evidence for this

hypothesis (Fig. 7). Furthermore, in contrast to our findings on network activities showing a clear distinction between R and H (Figs. 2, 3), we observed that neuronal activity was sensitive to both behavior (R vs H) and degree of control of the stress exposure (ES vs IS). Hence, we reasoned that the neural correlates of controllability and helplessness would be best represented in R-ES and H-IS neurons, so we focused on the latter groups for firing rate analyses. We analyzed the firing rates of spike-sorted neurons from NS ( $N = 21$ ), R-ES ( $N = 33$ ), H-ES ( $N = 7$ ), R-IS ( $N = 14$ ), and H-IS ( $N = 35$ ; Fig. 7A). We observed a higher incidence of significantly stimulus-modulated neurons in stressed than NS animals [ $\chi^2(1, N = 110) = 14.65$ ,  $p = 0.0001$ ]. Differently from the hypothesis of PFC excitability under controllable stress, the proportions of excited or suppressed neurons did not differ between R-ES and H-IS, regardless of the trigger [CS<sup>+</sup>:  $\chi^2(2, N = 68) = 0.87$ ,  $p = 0.64$ ; US:  $\chi^2(2, N = 68) = 0.11$ ,  $p = 0.94$ ; Fig. 7B]. Finally, we separately analyzed these subsamples of neurons, and found that excitation was actually enhanced in H-IS neurons, specifically after US termination ( $F_{(2,35)} = 35.91$ ,  $p < 0.0001$ ; R-ES vs H-IS  $t_{(35)} = 4.34$ ,  $p = 0.0001$ ; Fig. 7C,D).

Apart from the averaged patterns of Figure 7C,D, we observed a diversity of differential CS<sup>+</sup>-evoked versus US-evoked firing modulations across individual neurons. Interestingly, this diversity was greater among stressed animals, suggesting that the differences between CS and US may be related to the encoding of stress-relevant information at the single-neuron level. To approach this question, we calculated the magnitude of US-evoked versus CS-evoked responses (i.e., the difference between their absolute values) across groups (Fig. 7E). This approach revealed an interesting marker of stress controllability ( $F_{(2,54)} =$

3.02,  $p = 0.056$ , R-ES vs H-IS  $t_{(54)} = 2.41$ ,  $p = 0.019$ ): preferential neural reactivity to CS<sup>+</sup> in R-ES ( $-4.45 \pm 2.95$  Z-score) and to US in H-IS ( $3.70 \pm 2.77$  Z-score; Fig. 7E). Next, we characterized perievent patterns using PCA. The resistant PC1 (28% explained variance,  $N = 47$ ) was characterized by a sustained increase in firing rate during CS<sup>+</sup>, with a fast return to baseline after US. In contrast, the helpless PC1 (36% explained variance,  $N = 42$ ) was rather characterized by phasic responses at CS<sup>+</sup> onset, but long-lived excitation at US offset (Fig. 7G). We then examined how well these perievent patterns would approximate those of CS<sup>+</sup>-modulated or US-modulated neurons in R-ES versus H-IS. For this, correlations between PC1 coefficients and mean Z-scored firing rates of each neuron were converted to absolute values. We found that R-ES neurons showed greater correlation with the resistant PC1 ( $H_{(2)} = 26.28$ ,  $p < 0.0001$ ; R-ES vs H-IS  $U = 97$ ,  $p = 0.06$ ), and H-IS neurons with the helpless PC1 ( $H_{(2)} = 27.04$ ,  $p < 0.0001$ ; R-ES vs H-IS  $U = 102$ ,  $p = 0.09$ ; Fig. 7G). These findings demonstrate that PFC encoding of stressor controllability and uncontrollability are represented as complex perievent profiles around conditioned and unconditioned aversive stimuli. Our data also suggest an interdependence of these firing patterns on both the degree of control and the future behavior, strengthening a link between controllability, PFC activity, and acquisition of either resistance or helplessness.

#### PFC neurons modulated under controllable stress are coupled with $\theta$ phase and rhythm

Next, we investigated the interactions between single-neuron and oscillatory activities under controllable or uncontrollable stress. Initially, we observed that a proportion of neurons in stressed animals (22.80%,  $N = 13/44$ ) showed significant phase-locked spiking to  $\theta$  field potentials (Rayleigh's Z test,  $p < 0.01$ ; see representative traces in Fig. 8A). In contrast, no phase-locked neurons were found in NS animals [0%,  $N = 0/15$ ;  $\chi^2(1, N = 72) = 4.17$ ,  $p = 0.041$ ; Fig. 8B]. Additionally, all neurons that were phase-locked to  $\theta$  LFP were also modulated by stress [phase-locked modulated 100%,  $N = 13/13$ ; vs nonmodulated 52%,  $N = 23/44$ ;  $\chi^2(1, N = 57) = 9.82$ ,  $p = 0.001$ ; Fig. 8C]. Then, we observed that modulated neurons in R-ES animals were more strongly phase-locked to PFC  $\theta$  (representative units with both phase-locking and CS<sup>+</sup> responsivity are shown in Fig. 8D) than those of H-IS animals ( $H_{(2)} = 13.19$ ,  $p = 0.001$ ; R-ES vs H-IS  $U = 39$ ,  $p = 0.01$ ; Fig. 8E). We then investigated the possible association between LFP power and the spiking activity of neurons by estimating the PSDs of STA LFP. We found a prominent peak of STA  $\theta$  power in R-ES modulated neurons ( $H_{(2)} = 11.35$ ,  $p = 0.003$ ; NS vs. R-ES  $U = 24$ ,  $p = 0.003$ ; R-ES vs. H-IS  $U = 27$ ,  $p = 0.002$  (Fig. 8F). We also explored spike rhythmicity itself by applying PSD analysis to the binary spiking data. This approach revealed stronger  $\theta$  power among stimulus-modulated neurons of R-ES than NS or H-IS (Fig. 8G). Interestingly, some  $\theta$ -rhythmic neurons also corresponded to the patterns of differential modulation by CS<sup>+</sup> versus US we described earlier: the resistant PC1 (greater to CS<sup>+</sup>), the helpless PC1 (greater to US), and the stressor PC2 (opposed between CS<sup>+</sup> and US; Fig. 9, see also Fig. 7F). Altogether, our results suggest that  $\theta$  rhythm coordinates the neuronal dynamics associated with stressor controllability and learned resistance within the PFC.

#### PFC and HPC network activities accurately discriminate individuals under stress and predict resistance to future uncontrollable stressors

Throughout this study, we reported a number of electrophysiological markers discriminating stressed from nonstressed animals

(stressor-related variables), and R from H animals (controllability-related variables). We show that these variables are associated with distinct features of HPC-PFC  $\theta$  oscillations, which in turn coordinate PFC neuronal firing patterns related to controllability. Our final approach was to explore patterns of activity that collectively comprise these variables and to examine how they could distinguish the effects of stress per se and predict resistance or helplessness.

The most relevant discriminators of stress and NS were: (1) elevation of HPC  $\theta$  peak frequency after US (% from CS; AUC = 0.97; Fig. 4); (2) reduction of HPC  $\beta$  ERPP (maximum at 24.0 Hz; AUC = 0.99; Fig. 3); (3) HPC-PFC  $\theta$  synchronization (AUC = 0.92; Figs. 5, 10A1–A3). In turn, the most relevant predictors of learned resistance and helplessness were: (4) HPC-PFC  $\theta$  synchrony during CS<sup>+</sup> (AUC = 0.87; Fig. 5); (5) PFC prestimulus  $\theta$ - $\gamma$  MI (AUC = 0.79; Fig. 6); (6) increase in HPC  $\theta$  ERPP (maximum at 7.7 Hz; AUC = 0.92; Figs. 2, 3); (7) PFC ERPP spectrum (2.5–50 Hz) PC1 score (AUC = 0.95; Figs. 2, 10A,B). We reasoned that we would be able to assemble the variables separately related to either stressor or controllability by computing factor analysis for two common factors (Fig. 10A,B). In fact, factor 1 loadings showed greater weights at controllability-related variables (>0.5), and lower weights at stressor-related variables (controllability factor; Fig. 10B). In turn, factor 2 loadings presented greater weights at stressor-related variables (> 0.5), and lowest weights at variables with bidirectional modulation by the degree of control (stressor factor; Fig. 10B). Consistently, the loadings of stressor and controllability factors resembled the univariate classification accuracies of each variable for stressed (vs NS) and R (vs H) subjects (Fig. 10B, dashed lines). Hierarchical clustering confirmed such distinction by showing that stressor-related and controllability-related variables are indeed dissociable (Fig. 10C). Thus, we obtained two scores representing the collective patterns of electrophysiological features related specifically to either controllability or stress per se.

Then we fitted a regularized linear discriminant classifier model based solely on these two predictors: stressor and controllability scores. Remarkably, our model reached 100% classification accuracy for all NS, R and H individuals simultaneously (100%, cross-validation: 92%,  $N = 26$ ; Fig. 10A). Additionally, the model was also able to predict the behavioral outcomes of R-IS and H-IS animals (100%,  $N = 6$ ), when fitted against NS, R-ES, and H-IS data ( $N = 20$ ). Furthermore, we noticed that the arrangement of individuals revealed a striking characteristic. Although stressor scores were greater in both R and H animals compared with NS ( $F_{(2,23)} = 52.49$ ,  $p < 0.0001$ ; R vs NS  $t_{(23)} = 10.21$ ,  $p < 0.0001$ ; H vs NS  $t_{(23)} = 6.93$ ,  $p < 0.0001$ ; R vs H  $t_{(23)} = 3.37$ ,  $p = 0.002$ ), controllability scores were only significantly greater in R individuals ( $F_{(2,23)} = 15.51$ ,  $p < 0.0001$ ; R vs NS  $t_{(23)} = 4.31$ ,  $p = 0.0003$ ; R vs H  $t_{(23)} = 4.95$ ,  $p < 0.0001$ ), while H and NS were virtually identical (H vs NS  $t_{(23)} = 0.06$ ,  $p = 0.94$ ).

We also examined the presence of collective patterns of electrophysiological data across individuals through hierarchical clustering. This examination revealed three clearly distinct clusters fitting almost entirely the three behavioral categories of our study: R, H, and NS. Consistent with our model, the distinguishable patterns of activity (represented by cluster centroids, Fig. 10D) showed that the resistant cluster pattern was formed by the summation of stressor and controllability effects, while the helpless cluster pattern exhibited a clear resemblance to the stressor factor (Fig. 10D; see also Fig. 10B). This finding further illustrates that the neural activity underlying helplessness is essentially characterized by the effects of stress per se. Moreover, the



**Table 1. Neural correlates of stressor, controllability, and uncontrollability**

Variable	Stressor	Control	Uncontrol
HPC $\theta$ power*		↑	↓
HPC wide range power*	↓		
PFC $\theta$ power		↑	↓
PFC power perturbation PC1*		↑	↓
HPC $\theta$ peak frequency*	US>CS		
HPC-PFC synchrony**	↑	↑↑	
PFC $\theta$ phase resetting			↑
PFC $\theta$ - $\gamma$ coupling*		↑	
PFC firing rate modulation	↑	CS>US	US>CS
PFC neuronal phase locking	↑	↑↑	

\*variables used in the linear model, HPC = hippocampus, PFC = medial prefrontal cortex, CS = conditioned stimulus (light cue), US = unconditioned stimulus (footshock).

predominantly helpless cluster and the no stress cluster were clustered together in reference to the resistant cluster, which demonstrates that this latter group had the most distinctive activity (Fig. 10E). In fact, we identified the most distinctive collective pattern across subjects through PCA (48% explained variance,  $N = 26$ ), and we observed that the PC1 scores showed the highest univariate prediction of R individuals ( $AUC = 0.98$ ,  $n = 11/26$ ), and the greatest correlation with escape performance reported in this study ( $r_{(18)} = 0.77$ ,  $p < 0.0001$ ; data not shown).

In summary, we found a clear dissociation between the effects of controllability and stress per se that defined the unique patterns of activity of nonstressed, R, and H individuals. Altogether, our findings converge to suggest that learned stressor resistance is associated with a distinctive collective pattern of enhanced HPC-PFC network  $\theta$  activity during stress that is predominantly lacking in H individuals.

## Discussion

Here, we performed the first electrophysiological investigation of animals during controllable or uncontrollable stress. We demonstrate that stressor controllability is associated with a distinctive pattern of enhanced hippocampal-prefrontal  $\theta$  activity that predicts resistance against subsequent uncontrollable shocks, and that was predominantly absent in H individuals. The components of the controllability pattern and the stressor pattern are summarized in Table 1.

Unlike other animal models of depression based on natural individuals predispositions (Russo et al., 2012), the triadic design of learned helplessness models experiential factors that determine the outcomes of a stressful exposure. Our data link R-ES and H-IS to well-defined neural signatures, which can now be interpreted as correlates of the degrees of control over stress. Also interestingly, the neurophysiological profiles of the unforeseen minor subsamples R-IS and H-ES were consistent with their behavioral outcomes rather than their programmed stress exposure. We can attribute the incidence of R-IS to individual predispositions or accidental contingencies during the experiment (Skinner, 1948). In turn, the absence of the controllability signature in H-ES indicates that this activity is more linked to the “immunization” effect of behavioral control than to escape responses. In fact, PFC inhibition has been shown to spare escaping behavior, which is known to depend on subcortical structures (Canteras and Graeff, 2014), while abolishing the protective effects of controllability against subsequent induction of helplessness (Amat et al., 2005, 2006).

### $\theta$ Functions and stressor controllability

Mounting evidence indicates that  $\theta$  oscillations have a role in processing aversive information (Gray and McNaughton, 2000;

Likhtik and Gordon, 2014; Bocchio et al., 2017; Çalıřkan and Stork, 2019). Many reports describe increased  $\theta$  power and synchrony during different stressors, including exposure to distant predators, aggressive conspecifics, anxiogenic environments, and conditioned fear (Sainsbury et al., 1987; Seidenbecher et al., 2003; Adhikari et al., 2010; Lesting et al., 2011; Hultman et al., 2018; Mikulovic et al., 2018). These observations suggest that  $\theta$  oscillations may signal averseness and represent a correlate of fear and anxiety. In our study, we observed increases in  $\theta$  power in R, but not H, animals. This finding is intriguing, given that helplessness is linked to exaggerated passive fear responses (Baratta et al., 2007). In this context, Courtin et al. (2014) reported suppression of PFC  $\theta$  power during freezing, whereas Karalis et al. (2016) showed that abolishing  $\theta$  activity does not alter freezing behavior. Although we observed CS<sup>+</sup>-evoked  $\theta$  synchronization in both R and H animals, which supports its role in signaling averseness, the strength of this synchrony was related to escape performance, which favors the role of  $\theta$  activity in active coping. Adhikari et al. (2010) also reported that increased HPC-PFC  $\theta$  synchrony in anxiogenic places predicts active avoidance toward safer zones. Causal evidence was recently provided by Padilla-Coreano et al. (2019), which showed that oscillatory optogenetic stimulation of the HPC-PFC pathway in the  $\theta$  frequency promotes avoidance in the elevated plus maze. Also, Carlson et al. (2017) showed that  $\theta$ - $\gamma$  PFC stimulation promotes active struggling in the tail suspension test. Thus, high  $\theta$  states during immobile fear behavior could be interpreted as the encoding of active responses, which is supported by the role of  $\theta$  oscillations in sensorimotor integration and action selection (Oddie and Bland, 1998; Bender et al., 2015).

The differences in network dynamics related to stressor controllability were only observed during the CS<sup>+</sup> period. On the other hand, we found consistent US-induced increases of  $\theta$  frequency regardless of controllability. This finding is consistent with reports showing that  $\theta$  frequency increases with movement but persist for some time after the animal ceases it (McFarland et al., 1975), e.g., after high shock-avoidance jumps (Vanderwolf, 1969; Whishaw and Vanderwolf, 1973; Lenck-Santini et al., 2008) or pain-evoked behaviors (Khanna, 1997; Tai et al., 2006). Since we restricted our analyses to locomotion-free epochs, the neural signatures found during the anticipation of shocks may indeed represent correlates of distinct “expectations” of either controllability or uncontrollability.

Another finding reported here was the strong correlation of PFC  $\theta$  power-synchrony during stress with later escape performance. In fact, extensive research has demonstrated that  $\theta$  activity correlates with numerous forms of cognitive performance mostly related to memory encoding and retrieval, and executive functioning (Cavanagh and Frank, 2014; Hasselmo and Stern, 2014; Korotkova et al., 2018). Taken together, our results suggest that HPC-PFC  $\theta$  activity supports cognitive mechanisms of stress resistance. In contrast,  $\theta$  impairments in helplessness could mean that this syndrome stems from learning deficits rather than a learned response.

The intermediate HPC sends projections to the PFC and has been shown to participate in both cognitive and emotional functions (Fanselow and Dong, 2010).  $\theta$  Oscillations are generated in the septal-hippocampal circuitry and synchronize with downstream targets on demand (Vertes and Kocsis, 1997; Buzsáki, 2002). Indeed, we observed that the HPC  $\theta$  field entrained the PFC with a constant lag of 49 ms, consistently with previous reports (Siapas et al., 2005). However, we present evidence that

local PFC  $\theta$  activity is important for stressor controllability. We observed a stronger correlation of PFC  $\theta$  power with escape performance, and a unique association between stress resistance/controllability and PFC  $\theta$  coupling to both fast oscillations and neuronal firing, which are known to be anatomically localized (Buzsáki et al., 2012). Thus, we conclude that the controllability pattern identified here represents an increased HPC-PFC network interaction that supports local processing in the PFC.

We report the surprising feature that differential firing to CS<sup>+</sup> and US possibly encode controllability-related information, and we evidence that these firing patterns are coordinated by  $\theta$  rhythm. Prelimbic neurons have also been shown to signal averseness (Burgos-Robles et al., 2009; Sotres-Bayon and Quirk, 2010; Adhikari et al., 2011; Courtin et al., 2014; Diehl et al., 2018). Thus, we can interpret the immediate return to baseline firing after controllable US to represent the realization that averseness is no longer present. In contrast, the enduring responses after uncontrollable shocks in H animals would represent an impairment in such realization. It is worth mentioning that animals tend to generalize the expectations of either controllability or uncontrollability (Maier and Seligman, 1976), which makes it challenging to attribute single-neuron responses to distinct degrees of control. Nevertheless, our findings are sufficient to indicate that  $\theta$  oscillations coordinate local PFC activity associated with the encoding of stressor controllability.

### $\theta$ Impairment and helplessness

Our study suggests that helplessness might be associated with impaired  $\theta$  engagement. This is consistent with reports that uncontrollable stress induces brain-wide serotonergic activation, which is the main modulatory system that suppresses  $\theta$  (Vertes and Kocsis, 1997; Maier and Watkins, 1998; Puig and Gener, 2015). Serotonin-induced effects related to helplessness arise mostly from the dorsal raphe nucleus (Maier and Watkins, 2005), which receives regulatory projections from the PFC (Pollak Dorocic et al., 2014). This descending pathway has been consistently shown to mediate the protective effects of behavioral control (Warden et al., 2012; Maier, 2015). Furthermore, although there are no known projections from the HPC to the dorsal raphe nucleus, its neurons can be phase-locked to the  $\theta$  field (Kocsis and Vertes, 1992; Pollak Dorocic et al., 2014). Thus, we speculate that  $\theta$  influence on the dorsal raphe nucleus may be mediated via PFC, and that  $\theta$  synchrony between these two regions may facilitate brain-wide stress-protective effects. Future studies should address these questions.

Maier and Seligman initially proposed that uncontrollability would be the key variable that, once learned, would change behavior (Seligman and Maier, 1967; Maier and Seligman, 1976). When PFC inhibition during controllable stress resulted in helplessness (Amat et al., 2005), the authors revisited the theory to suggest that actually controllability is the determining factor to be learned. In this sense, helplessness would develop as a default response to severe stress if controllability is absent (Maier and Seligman, 2016). We found that R and H individuals share electrophysiological markers of stress, but only R animals present the neural signature of controllability, in line with Maier and Seligman (Maier and Seligman, 2016).

Finally, our findings are in agreement with emerging treatment approaches for clinical depression. A recent meta-analysis concluded that frontal  $\theta$  power was the electroencephalographic predictor of antidepressant response that was closest to proof of concept (Widge et al., 2019). Also,  $\theta$ -burst transcranial magnetic stimulation of the PFC is a promising therapy against refractory

depression (Cole et al., 2020). Here, we provide experimental evidence for a positive link between stress resilience and prefrontal  $\theta$ , encouraging investigation of this activity as both a biomarker and a target in psychiatric treatments.

In conclusion,  $\theta$  oscillations have been discussed to signal states of fear, anxiety, and stress vulnerability. By adding the controllability dimension to this scenario, we show that HPC-PFC  $\theta$  activity may actually play a role in stress resistance. With our findings, we propose that the functions of hippocampal-prefrontal  $\theta$  in stress, aversion, action selection, top-down regulation, learning, and cognitive control are integrated into a multidimensional continuum that underlies active coping against stressors.

### References

- Adhikari A, Topiwala MA, Gordon JA (2010) Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. *Neuron* 65:257–269.
- Adhikari A, Topiwala MA, Gordon JA (2011) Single units in the medial prefrontal cortex with anxiety-related firing patterns are preferentially influenced by ventral hippocampal activity. *Neuron* 71:898–910.
- Amat J, Matus-Amat P, Watkins LR, Maier SF (1998) Escapable and inescapable stress differentially and selectively alter extracellular levels of 5-HT in the ventral hippocampus and dorsal periaqueductal gray of the rat. *Brain Res* 797:12–22.
- Amat J, Baratta MV, Paul E, Bland ST, Watkins LR, Maier SF (2005) Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci* 8:365–371.
- Amat J, Paul E, Zarza C, Watkins LR, Maier SF (2006) Previous experience with behavioral control over stress blocks the behavioral and dorsal raphe nucleus activating effects of later uncontrollable stress: role of the ventral medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 26:13264–13272.
- Amat J, Alekseyev RM, Paul E, Watkins LR, Maier SF (2010) Behavioral control over shock blocks behavioral and neurochemical effects of later social defeat. *Neuroscience* 165:1031–1038.
- Balleine BW, Curthoys IS (1991) Differential effects of escapable and inescapable footshock on hippocampal theta activity. *Behav Neurosci* 105:202–209.
- Baratta MV, Christianson JP, Gomez DM, Zarza CM, Amat J, Masini CV, Watkins LR, Maier SF (2007) Controllable versus uncontrollable stressors bi-directionally modulate conditioned but not innate fear. *Neuroscience* 146:1495–1503.
- Barnett L, Seth AK (2014) The MVGC multivariate Granger causality toolbox: a new approach to Granger-causal inference. *J Neurosci Methods* 223:50–68.
- Bender F, Gorbati M, Cadavieco MC, Denisova N, Gao X, Holman C, Korotkova T, Ponomarenko A (2015) Theta oscillations regulate the speed of locomotion via a hippocampus to lateral septum pathway. *Nat Commun* 6:8521.
- Berens P (2015) CircStat: a MATLAB toolbox for circular statistics. *J Stat Softw* 31:1–21.
- Bocchio M, Nabavi S, Capogna M (2017) Synaptic plasticity, engrams, and network oscillations in amygdala circuits for storage and retrieval of emotional memories. *Neuron* 94:731–743.
- Bueno-Junior LS, Simon NW, Wegener MA, Moghaddam B (2017) Repeated nicotine strengthens gamma oscillations in the prefrontal cortex and improves visual attention. *Neuropsychopharmacology* 42:1590–1598.
- Bueno-Junior LS, Peixoto-Santos JE, Ruggiero RN, Ávila MAV, Marques DB, Lopes-Aguiar C, Leite JP (2018) Interaction between hippocampal-prefrontal plasticity and thalamic-prefrontal activity. *Sci Rep* 8:1382.
- Burgos-Robles A, Vidal-Gonzalez I, Quirk GJ (2009) Sustained conditioned responses in prefrontal neurons are correlated with fear expression and extinction failure. *J Neurosci* 29:8474–8482.
- Buzsáki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33:325–340.
- Buzsáki G, Draguhn A (2004) Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304:1926–1929.
- Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C (2012) The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci* 13:407–420.

- Çalışkan G, Stork O (2019) Hippocampal network oscillations at the interplay between innate anxiety and learned fear. *Psychopharmacology (Berl)* 236:321–338.
- Canteras NS, Graeff FG (2014) Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: implications for panic disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 46:352–364.
- Carlson D, David LK, Gallagher NM, Vu MAT, Shirley M, Hultman R, Wang J, Burrus C, McClung CA, Kumar S, Carin L, Mague SD, Dzirasa K (2017) Dynamically timed stimulation of corticolimbic circuitry activates a stress-compensatory pathway. *Biol Psychiatry* 82:904–913.
- Cathomas F, Murrrough JW, Nestler EJ, Han MH, Russo SJ (2019) Neurobiology of resilience: interface between mind and body. *Biol Psychiatry* 86:410–420.
- Cavanagh JF, Frank MJ (2014) Frontal theta as a mechanism for cognitive control. *Trends Cogn Sci* 18:414–421.
- Chapin JK, Nicolelis MAL (1999) Principal component analysis of neuronal ensemble activity reveals multidimensional somatosensory representations. *J Neurosci Methods* 94:121–140.
- Cole EJ, Stimpson KH, Bentzley BS, Gulser M, Cherian K, Tischler C, Nejad R, Pankow H, Choi E, Aaron H, Espil FM, Pannu J, Xiao X, Duvio D, Solvason HB, Hawkins J, Guerra A, Jo B, Raj KS, Phillips AL, et al. (2020) Stanford accelerated intelligent neuromodulation therapy for treatment-resistant depression. *Am J Psychiatry* 177:716–726.
- Courtin J, Chaudun F, Rozeske RR, Karalis N, Gonzalez-Campo C, Wurtz H, Abdi A, Baufreton J, Bienvenu TCM, Herry C (2014) Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature* 505:92–96.
- Diehl MM, Bravo-Rivera C, Rodriguez-Romaguera J, Pagan-Rivera PA, Burgos-Robles A, Roman-Ortiz C, Quirk GJ (2018) Active avoidance requires inhibitory signaling in the rodent prelimbic prefrontal cortex. *Elife* 7:e34657.
- Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:7–19.
- Feder A, Fred-Torres S, Southwick SM, Charney DS (2019) The biology of human resilience: opportunities for enhancing resilience across the life span. *Biol Psychiatry* 86:443–453.
- Godsil BP, Kiss JP, Spedding M, Jay TM (2013) The hippocampal-prefrontal pathway: the weak link in psychiatric disorders? *Eur Neuropsychopharmacol* 23:1165–1181.
- Gordon JA (2011) Oscillations and hippocampal-prefrontal synchrony. *Curr Opin Neurobiol* 21:486–491.
- Grandchamp R, Delorme A (2011) Single-trial normalization for event-related spectral decomposition reduces sensitivity to noisy trials. *Front Psychol* 2:1–14.
- Gray JA, McNaughton N (2000) The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the function of the septo-hippocampal system. Oxford University Press, Oxford.
- Hasselmo ME, Stern CE (2014) Theta rhythm and the encoding and retrieval of space and time. *Neuroimage* 85:656–666.
- Hultman R, Ulrich K, Sachs BD, Blount C, Carlson DE, Ndubuizu N, Bagot RC, Parise EM, Vu MAT, Gallagher NM, Wang J, Silva AJ, Deisseroth K, Mague SD, Caron MG, Nestler EJ, Carin L, Dzirasa K (2018) Brain-wide electrical spatiotemporal dynamics encode depression vulnerability. *Cell* 173:166–180.e14.
- Jay TM, Rocher C, Hotte M, Naudon L, Gurden H, Spedding M (2004) Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses is impaired by loss of dopamine and stress: importance for psychiatric diseases. *Neurotox Res* 6:233–244.
- Joca SRL, Padovan CM, Guimarães FS (2003) Activation of post-synaptic 5-HT1A receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. *Brain Res* 978:177–184.
- Kalisch R, Müller MB, Tüscher O (2015) A conceptual framework for the neurobiological study of resilience. *Behav Brain Sci* 38:e92.
- Karalis N, Dejean C, Chaudun F, Khoder S, R, Rozeske R, Wurtz H, Bagur S, Benchenane K, Sirota A, Courtin J, Herry C (2016) 4-Hz oscillations synchronize prefrontal-amygdala circuits during fear behavior. *Nat Neurosci* 19:605–612.
- Khanna S (1997) Dorsal hippocampus field CA1 pyramidal cell responses to a persistent versus an acute noxious stimulus and their septal modulation. *Neuroscience* 77:713–721.
- Kim YC, Han SW, Alberico SL, Ruggiero RN, De Corte B, Chen KH, Narayanan NS (2017) Optogenetic stimulation of frontal D1 neurons compensates for impaired temporal control of action in dopamine-depleted mice. *Curr Biol* 27:39–47.
- Kocsis B, Vertes RP (1992) Dorsal raphe neurons: synchronous discharge with the theta rhythm of the hippocampus in the freely behaving rat. *J Neurophysiol* 68:1463–1467.
- Korotkova T, Ponomarenko A, Monaghan CK, Poulter SL, Cacucci F, Wills T, Hasselmo ME, Lever C (2018) Reconciling the different faces of hippocampal theta: the role of theta oscillations in cognitive, emotional and innate behaviors. *Neurosci Biobehav Rev* 85:65–80.
- Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J, Varela FJ (1999) Measuring phase synchrony in brain signals. *Hum Brain Mapp* 8:194–208.
- Lenck-Santini PP, Fenton AA, Muller RU (2008) Discharge properties of hippocampal neurons during performance of a jump avoidance task. *J Neurosci* 28:6773–6786.
- Lesting J, Narayanan RT, Kluge C, Sangha S, Seidenbecher T, Pape HC (2011) Patterns of coupled theta activity in amygdala-hippocampal-prefrontal cortical circuits during fear extinction. *PLoS One* 6:e21714.
- Likhtik E, Gordon JA (2014) Circuits in sync: decoding the theta communication in fear and safety. *Neuropsychopharmacology* 39:235–236.
- Maier SF (2015) Behavioral control blunts reactions to contemporaneous and future adverse events: medial prefrontal cortex plasticity and a corticostriatal network. *Neurobiol Stress* 1:12–22.
- Maier SF, Seligman MEP (1976) Learned helplessness: theory and evidence. *J Exp Psychol* 105:1–56.
- Maier SF, Seligman MEP (2016) Learned helplessness at fifty: insights from neuroscience. *Psychol Rev* 123:1–19.
- Maier SF, Watkins LR (1998) Stressor controllability, anxiety, and serotonin. *Cognit Ther Res* 22:595–613.
- Maier SF, Watkins LR (2005) Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev* 29:829–841.
- Maier SF, Amat J, Baratta MV, Paul E, Watkins LR (2006) Behavioral control, the medial prefrontal cortex, and resilience. *Dialogues Clin Neurosci* 8:397–406.
- McFarland WL, Teitelbaum H, Hedges EK (1975) Relationship between hippocampal theta activity and running speed in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 88:324–328.
- Mikulovic S, Restrepo CE, Siwani S, Bauer P, Pupe S, Tort ABL, Kullander K, Leão RN (2018) Ventral hippocampal OLM cells control type 2 theta oscillations and response to predator odor. *Nat Commun* 9:3638.
- Narayanan NS, Laubach M (2009) Methods for studying functional interactions among neuronal populations. *Methods Mol Biol* 489:135–165.
- Oddie SD, Bland BH (1998) Hippocampal formation theta activity and movement selection. *Neurosci Biobehav Rev* 22:221–231.
- Oostenveld R, Fries P, Maris E, Schoffelen JM (2011) FieldTrip: open source software for advanced analysis of MEG, EEG, and invasive electrophysiological data. *Comput Intell Neurosci* 2011:156869.
- Padilla-Coreano N, Canetta S, Mikofsky RM, Alway E, Passecker J, Myroshnychenko MV, Garcia-Garcia AL, Warren R, Teboul E, Blackman DR, Morton MP, Hupalo S, Tye KM, Kellendonk C, Kupferschmidt DA, Gordon JA (2019) Hippocampal-prefrontal theta transmission regulates avoidance behavior. *Neuron* 104:601–610.e4.
- Pollak Dorocic I, Fürth D, Xuan Y, Johansson Y, Pozzi L, Silberberg G, Carlén M, Meletis K (2014) A whole-brain atlas of inputs to serotonergic neurons of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuron* 83:663–678.
- Pryce CR, Azzinnari D, Spinelli S, Seifritz E, Tegethoff M, Meinschmidt G (2011) Helplessness: a systematic translational review of theory and evidence for its relevance to understanding and treating depression. *Pharmacol Ther* 132:242–267.
- Puig MV, Gener T (2015) Serotonin modulation of prefronto-hippocampal rhythms in health and disease. *ACS Chem Neurosci* 6:1017–1025.
- Rosenberg JR, Amjad AM, Breeze P, Brillinger DR, Halliday DM (1989) The Fourier approach to the identification of functional coupling between neuronal spike trains. *Prog Biophys Mol Biol* 53:1–31.
- Royer S, Sirota A, Patel J, Buzsáki G (2010) Distinct representations and theta dynamics in dorsal and ventral hippocampus. *J Neurosci* 30:1777–1787.
- Ruggiero RN, Rossignoli MT, Lopes-Aguiar C, Leite JP, Bueno-Junior LS, Romcy-Pereira RN (2018) Lithium modulates the muscarinic facilitation of synaptic plasticity and theta-gamma coupling in the hippocampal-prefrontal pathway. *Exp Neurol* 304:90–101.
- Russo SJ, Murrrough JW, Han M, Charney DS, Nestler EJ (2012) Neurobiology of resilience. *Nat Neurosci* 15:1475–1429.

- Sainsbury RS, Heynen A, Montoya CP (1987) Behavioral correlates of hippocampal type 2 theta in the rat. *Physiol Behav* 39:513–519.
- Seidenbecher T, Laxmi RT, Stork O, Pape HC (2003) Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science* 301:846–850.
- Seligman MEP, Maier SF (1967) Failure to escape traumatic shock. *J Exp Psychol* 74:1–9.
- Shors TJ, Seib TB, Levine S, Thompson RF (1989) Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation in the rat hippocampus. *Science* 244:224–226.
- Siapas AG, Lubenov EV, Wilson MA (2005) Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. *Neuron* 46:141–151.
- Skinner BF (1948) Superstition in the pigeon. *J Exp Psychol* 38:168–172.
- Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2010) Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr Opin Neurobiol* 20:231–235.
- Southwick SM, Charney DS (2012) The science of resilience: implications for the prevention and treatment of depression. *Science* 338:79–82.
- Tai SK, Huang FD, Mochhala S, Khanna S (2006) Hippocampal theta state in relation to formalin nociception. *Pain* 121:29–42.
- Thierry AM, Gioanni Y, Dégénétais E, Glowinski J (2000) Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 10:411–419.
- Tort ABL, Kramer MA, Thorn C, Gibson DJ, Kubota Y, Graybiel AM, Kopell NJ (2008) Dynamic cross-frequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20517–20522.
- Tort ABL, Komorowski RW, Manns JR, Kopell NJ, Eichenbaum H (2009) Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:20942–20947.
- Tort ABL, Komorowski R, Eichenbaum H, Kopell N (2010) Measuring phase-amplitude coupling between neuronal oscillations of different frequencies. *J Neurophysiol* 104:1195–1210.
- Vanderwolf CH (1969) Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 26:407–418.
- Varela JA, Wang J, Christianson JP, Maier SF, Cooper DC (2012) Control over stress, but not stress per se increases prefrontal cortical pyramidal neuron excitability. *J Neurosci* 32:12848–12853.
- Vertes RP, Kocsis B (1997) Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* 81:893–926.
- Vinck M, van Wingerden M, Womelsdorf T, Fries P, Pennartz CMA (2010) The pairwise phase consistency: a bias-free measure of rhythmic neuronal synchronization. *Neuroimage* 51:112–122.
- Vollmayr B, Gass P (2013) Learned helplessness: unique features and translational value of a cognitive depression model. *Cell Tissue Res* 354:171–178.
- Vollmayr B, Henn FA (2001) Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability. *Brain Res Brain Res Protoc* 8:1–7.
- Wang M, Perova Z, Arenkiel BR, Li B (2014) Synaptic modifications in the medial prefrontal cortex in susceptibility and resilience to stress. *J Neurosci* 34:7485–7492.
- Warden MR, Selimbeyoglu A, Mirzabekov JJ, Lo M, Thompson KR, Kim SY, Adhikari A, Tye KM, Frank LM, Deisseroth K (2012) A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. *Nature* 492:428–432.
- Whishaw IQ, Vanderwolf CH (1973) Hippocampal EEG and behavior: change in amplitude and frequency of RSA (theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats. *Behav Biol* 8:461–484.
- Widge AS, Bilge MT, Montana R, Chang W, Rodriguez CI, Deckersbach T, Carpenter LL, Kalin NH, Nemeroff CB (2019) Electroencephalographic biomarkers for treatment response prediction in major depressive illness: a meta-analysis. *Am J Psychiatry* 176:44–56.
- Willner P (1984) The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 83:1–16.
- Wood J, Kim Y, Moghaddam B (2012) Disruption of prefrontal cortex large scale neuronal activity by different classes of psychotomimetic drugs. *J Neurosci* 32:3022–3031.
- Yang Y, Cui Y, Sang K, Dong Y, Ni Z, Ma S, Hu H (2018) Ketamine blocks bursting in the lateral habenula to rapidly relieve depression. *Nature* 554:317–322.

### **3.2. ARTIGO II - Correlatos neurais de segurança e valência sobre o estresse**

A avaliação de segurança *versus* estresse e da valência, positiva *versus* negativa, sobre adversidades são dimensões centrais da experiência emocional e do enfrentamento do estresse. Desenvolvemos um novo protocolo comportamental que discrimina estados de medo, segurança, aproximação e esquiva em um único sujeito e uma estrutura de análise baseada em aprendizado de máquina para investigar como oscilações neurais podem decodificar tais estados. Nosso trabalho fornece uma demonstração formal de que o enfrentamento ao estresse é processado em várias regiões em todo o cérebro envolvendo oscilações de rede nas frequências teta, que sincronizam especialmente durante o medo e aproximação. Destacamos os potenciais de se combinar inteligência artificial e eletroencefalografia multilocal para orientar decisões terapêuticas em psiquiatria de precisão e de terapias de estimulação em teta para transtornos relacionados ao estresse, especialmente associados a déficits cognitivos e motivacionais.

#### **Destaques**

- a) Estados de medo *versus* segurança e de aproximação *versus* esquiva são decodificados pelos aumentos da potência e sincronia, bem como mudanças na direcionalidade, nas frequências teta na rede MLHFC.
- b) Relação positiva entre a performance de decodificação neural de estados comportamentais relacionados ao estresse e número de regiões incluídas.
- c) Modelos de decodificação treinados em um animal funcionam bem em novos dados do mesmo rato, mas falham em outros indivíduos.
- d) Padrões que decodificam estados de medo *versus* segurança e predizem aproximação *versus* esquiva em todos os indivíduos são caracterizados pelo aumento da sincronia encefálica em teta.

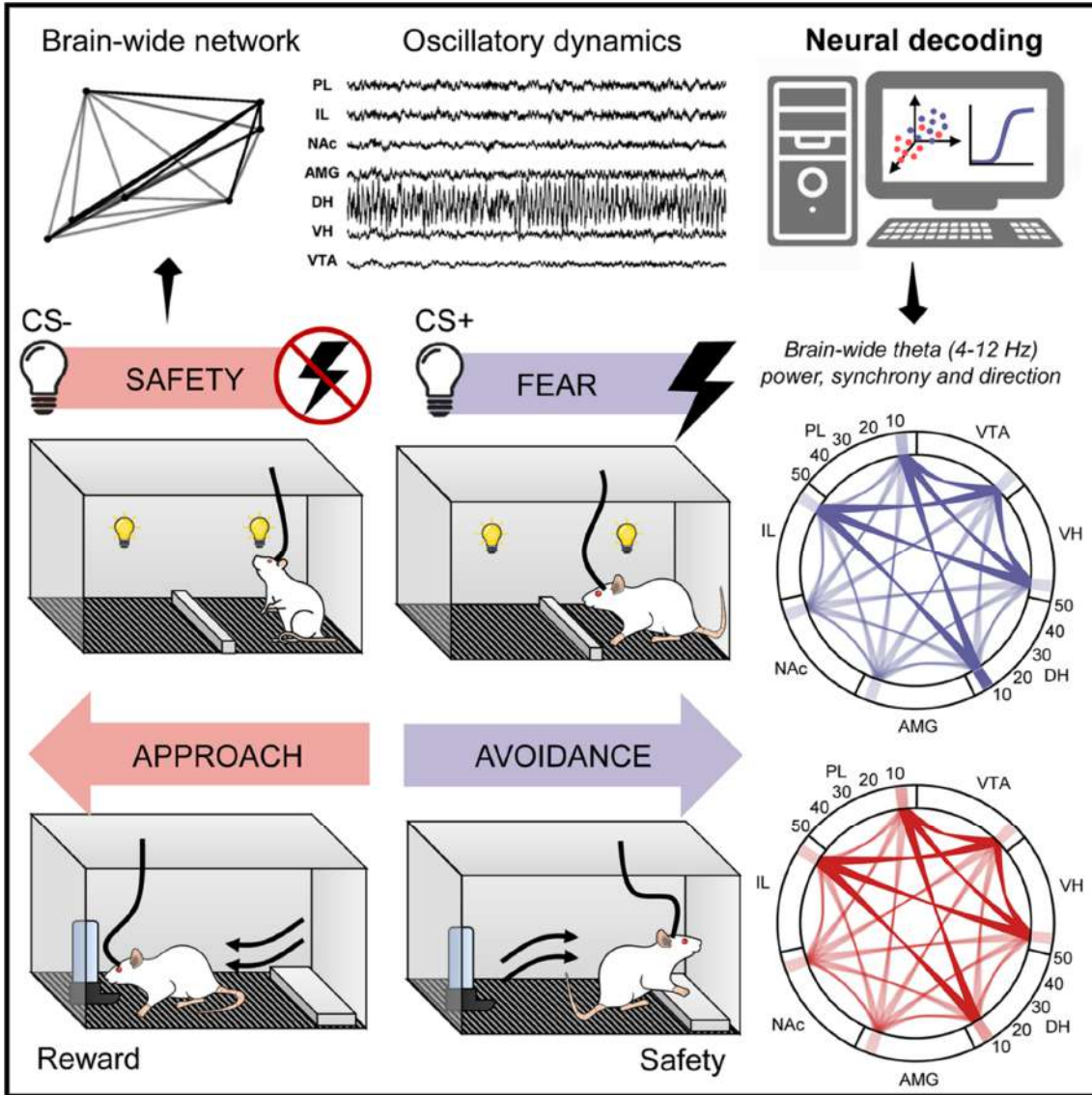


Figura 12 – Resumo gráfico do artigo II.

# **Decoding Fear or Safety and Approach or Avoidance by Brain-Wide Network Dynamics**

**Abbreviated title:** Neural decoding of safety and valence

Danilo Benette Marques<sup>1</sup>, Rafael Naime Ruggiero<sup>1,\*</sup>, Bruno de Avó Mesquita<sup>1</sup>, Leonardo Rakauskas Zacharias<sup>1</sup>, Matheus Teixeira Rossignoli<sup>1</sup>, João Pereira Leite<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Neuroscience and Behavioral Sciences, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil.

**\*Corresponding author:** rafaruggiero@gmail.com.br

## **Conflict of interest**

The authors declare no competing financial interests.

## **Acknowledgements**

This research was funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (D.B.M.: 88882.328283/2019-01; 88882.328297/2019-01), the National Council for Scientific and Technological Development (J.P.L.: 423977/2016-4), and the São Paulo Research Foundation (R.N.R.: 2018/02303-4; M.T.R.: 2020/01510-6; B.A.M.: 2019/03445-0; J.P.L.: 2016/17882-4). We thank Luis Fernando Luca, Antonio Renato Meirelles e Silva, Renata Caldo Scanduzzi, and Daniela Ribeiro for technical support. DBM, RNR and MTR designed the research. DBM, MTR, BAM, and LRZ developed the methodology. DBM conducted the experiments. DBM and RNR analyzed data. RNR and JPL supervised the project. All authors wrote and revised the manuscript.

## **Abstract**

Discerning safety from stress and positive or negative outcomes of adversity are fundamental for mental health. Many brain structures have been implicated in adaptive and maladaptive stress coping, however, how multiple regions function together as a network in the processing of this information is unclear. Here, we recorded local field potentials from seven regions of the mesolimbic-hippocampal-prefrontal cortical network (MLHFC) of male rats during the conditioning of a stimulus (CS) to the absence (safety) and then to the anticipation (fear) of footshocks, and during an approach-avoidance task. We developed a machine learning pipeline to investigate the relevance of specific features of oscillatory activity in the decoding of fear versus safety and approach versus avoidance. We found that decoding performance increased as a function of the number of regions included, reaching the best classification if all regions were considered. In addition, the best decoding was obtained from frequencies within the theta range. Remarkably, decoder models showed robust generalization within but not between individuals. Nevertheless, we were also able to identify patterns of MLHFC activity that decoded stress coping states from all rats. These patterns were characterized by increased brain-wide theta synchrony during fear and preceding approach. Our results indicate that stress coping information is encoded at the brain-wide level and highlight individual variability in this neural processing. Our findings also suggest that MLHFC network theta activity underlies active stress coping with both aversive and positive motivational valences.

**SIGNIFICANCE STATEMENT:** The appraisal of safety versus stress and positive versus negative valence of adversity are core dimensions of emotional experience and stress coping. We developed a new behavioral protocol that discriminates states of fear, safety, approach, and avoidance in a single subject and a machine learning method to investigate how neural oscillations can decode such states. Our work provides a formal demonstration that stress coping is processed at multiple regions on a brain-wide level involving network oscillations at the theta frequencies, which especially synchronizes during fear and approach. We highlight the potentials of combining artificial intelligence and multi-site electroencephalography to guide therapeutic decisions in precision psychiatry and theta-boosting stimulation therapies for stress-related disorders, especially related to cognitive and motivational deficits.



## Introduction

The ability to differentiate safe and stressful situations and the accurate appraisal of positive or negative outcomes from adversities are fundamental for survival and mental health (Kong et al., 2014; Southwick et al., 2015). Imbalances of these appraisals towards threat and aversion are hallmarks of psychiatric illnesses, such as post-traumatic stress disorder, generalized anxiety disorders, and major depression (Trew, 2011; Jovanovic et al., 2012; Gazendam et al., 2013). In turn, fostering stress regulation and positive emotions are therapeutic goals for these disorders and improve overall quality of life (Feder et al., 2019).

Many brain regions, including the prefrontal cortex, the hippocampus, the amygdala, and the mesolimbic reward system, have been implicated in processing adaptive and maladaptive stress coping (Godoy et al., 2018). Neural oscillations have been suggested to bind the activity of distant areas and underlie the encoding of information (Fries, 2015; Harris and Gordon, 2015), where the theta oscillations (4-12 Hz) are the most widely associated with cognition and emotion (Korotkova et al., 2018). Previous studies reported increases in limbic-cortical theta power and synchrony during avoidance in the elevated plus maze (Adhikari et al., 2010; Jacinto et al., 2016) and conditioned fear (Seidenbecher et al., 2003; Taub et al., 2018), implicating this activity in the “aversive” component of stress (Çalışkan and Stork, 2019). However, recent evidence indicates that hippocampal-prefrontal theta activity during fear is related to the expected controllability over stressors (Marques et al., 2022), which is associated with resilience (Maier et al., 2006). In addition, changes in prefrontal-amygdala theta directionality are associated with safety and fear extinction (Lesting et al., 2013; Likhtik et al., 2014). Furthermore, past investigations did not make explicit the rewarding component of stressful experiences. Therefore, how these activities are related to positive valence is unknown. A clearer dissection of safety and valence would elucidate the participation of theta activity in stress coping.

Although specific regions and projections have been implicated, it is theorized that multiple brain structures function together as a network in processing stress responses (Sousa, 2016; Grossman and Dzirasa, 2020). However, how these regions interact is unclear. Machine learning is an emergent and promising approach for identifying complex multivariate patterns of neural network activity and individual differences in brain function related to depression and resilience (Drysdale et al., 2017;

Dunlop et al., 2017; Vu et al., 2018). Recently, using machine learning, Hultman et al. (2018) successfully identified a brain-wide oscillatory pattern predicting resilient versus susceptible mice to social stress. However, the meaning of such patterns remains unclear, and the replicability of this approach is still a matter of debate.

To address these issues, we recorded local field potentials from seven regions of the mesolimbic-hippocampal-prefrontal cortical network (MLHFC) of rats in a new experimental design where an identical stimulus is conditioned to safety and then to fear and is tested in an approach-avoidance task with explicit reward, aversive and safe locations. Then, using machine learning, we investigated the performances of distinct features of oscillatory activity in decoding fear or safety and approach or avoidance. We hypothesized that neural decoding of stress states would perform better if the oscillatory activity of all regions recorded were used together. We observed that decoding performance improved as a function of the number of regions included in the model, achieving the highest performance if all regions were included. We also found that, across all frequencies, the best decoding happened within the theta range. Noteworthy, the decoder models exhibited generalization within each rat but not between individuals, demonstrating relevant individual variability in stress processing. Nevertheless, our algorithm discovered patterns of stronger brain-wide theta synchrony that decoded periods of fear and preceding approach across all rats. Our results demonstrate that stress coping is encoded at the brain-wide level and suggest that MLHFC network theta activity underlies active stress coping with both aversive, but especially, positive motivational valence.

## **Materials and Methods**

### **Subjects**

Adult male Sprague-Dawley rats (8-10 weeks old, Ribeirão Preto, Brazil) were housed singly in bedded cages in a temperature controlled room ( $22 \pm 2$  °C) on a 12 h light/dark cycle (lights on at 7 AM) with *ad libitum* access to food and water. The procedures followed the National Council for the Control of Animal Experimentation guidelines and were approved by the local Committee on Ethics in the Use of Animals (Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, protocol 0004/2020).

### **Electrode implantation surgery**

Animals were anesthetized with ketamine and xylazine (respectively: 50 mg/Kg and 25 mg/Kg intraperitoneal, followed by 70 mg/Kg and 35 mg/Kg intramuscular). Body temperature was kept constant during the entire procedure by a heating pad ( $37 \pm 1$  °C).

Multi-site electrode systems consisted of an eight-channel connector (Omnetics), each channel soldered to a bare silver wire (A-M Systems, 381  $\mu$ m). Monopolar electrodes (teflon-coated tungsten, 50  $\mu$ m) were lowered into each region, fixed with dental cement and soldered to a silver wire. The targeted bregma-referenced coordinates were: prefrontal cortex prelimbic (PL; anterior: 3 mm, lateral: 0.5 mm, ventral: 3.2 mm) and infralimbic areas (IL; anterior: 3 mm, lateral: 0.5 mm, ventral: 4.2 mm), nucleus accumbens shell (NAc; anterior: 1.7 mm, lateral: 0.6 mm, ventral: 6.8 mm), basolateral amygdala (AMG; posterior: 2.6 mm, lateral: 5.1 mm, ventral: 6.7 mm), dorsal hippocampus CA1 (DH; posterior: 4.2 mm, lateral: 4 mm, ventral: 2.8 mm), ventral hippocampus CA1 (VH; posterior: 4.8 mm, lateral: 5 mm, ventral: 7.5 mm), and ventral tegmental area (VTA; posterior: 5.8 mm, lateral: 0.8 mm, ventral: 8.2 mm) (Paxinos and Watson, 2009; Bueno-Junior et al., 2018; Marques et al., 2022).

In addition to the electrodes, microscrews were fastened into the skull, including a ground reference in the right occipital bone close to the lambda. Electrodes and screws were then cemented together with acrylic resin. Analgesic, antipyretic, and antibiotic drugs were injected after surgery. Animals were allowed to recover for 8-9 days before food restriction.

## **Behavioral apparatus**

### *Shuttle box*

We used a customized shuttle box system for simultaneous electrophysiological recording around shocks and behavioral monitoring (Marques et al., 2022). The behavioral apparatus was located inside a soundproof box and consisted of a chamber (54 cm length x 33 cm width x 50 cm height) divided into two compartments by a removable wall (1 cm length x 1.5 cm height). Footshocks were delivered through stainless steel bars on the floor. The apparatus contained eight equally spaced infrared beams, four per compartment, to track position and record crossings.

### *Reward and platform devices*

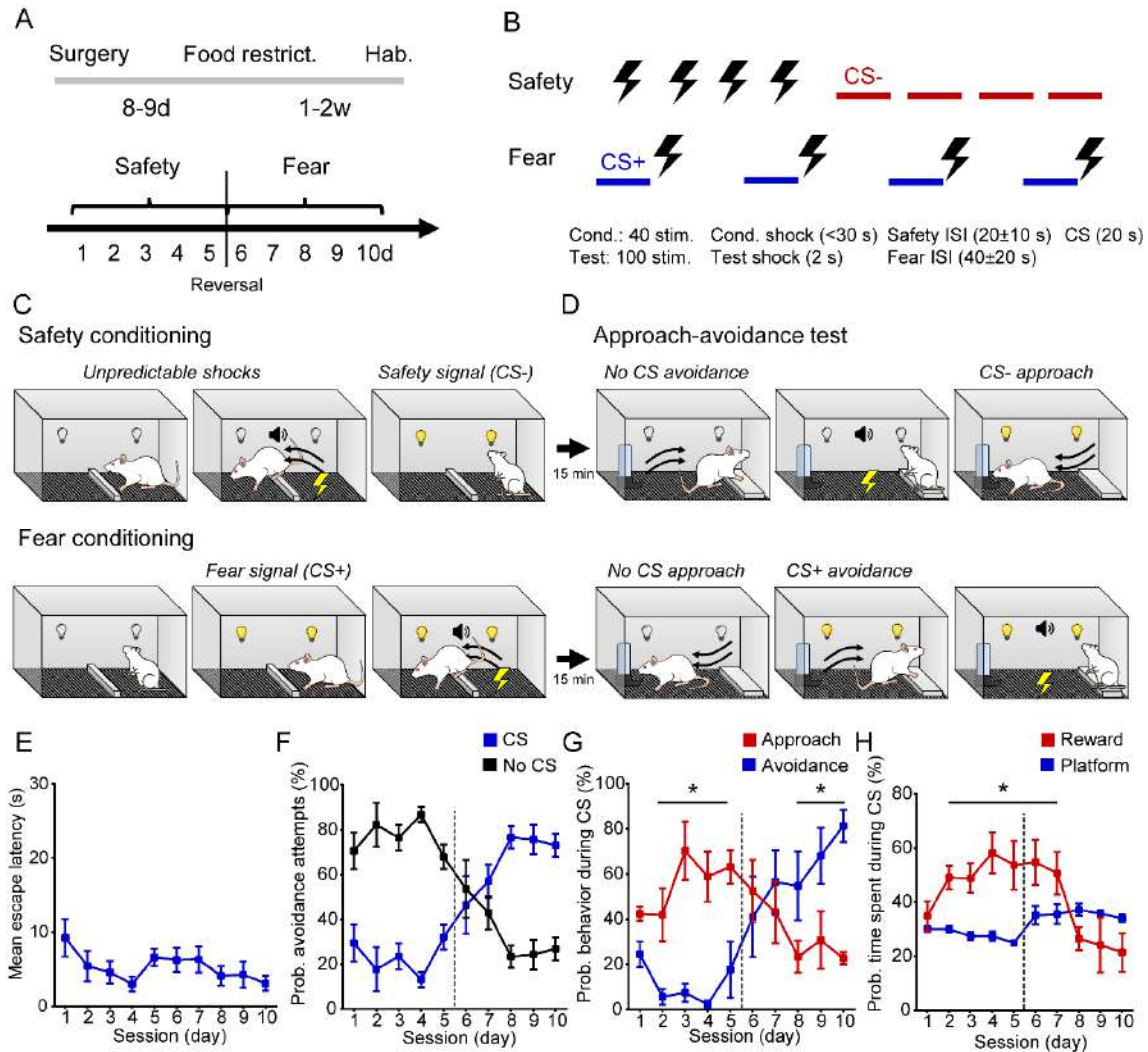
We customized a reward delivering device and a footshock-avoiding platform with presence sensors. The reward device was developed over a bird feeder with a single opening (3 cm length x 1.9 cm width x 1.7 cm height) that allowed the entry of the rostral part of the rat's head. The feeder was attached to a 50 ml falcon tube filled with 50 ml of a 20% sucrose solution before each session. We soaked the device on vanilla odor to serve as a cue. Two infrared emitter-sensor 0.3 mm LED pairs were fixed in the laterals of the feeder to detect the rat's head during reward consumption. Before each approach-avoidance test, the reward device was fixed on the left wall of the shuttle box, while the platform (8 cm length x 16 cm width x 1.5 cm height) was placed in the right corner. A single infrared emitter-sensor 0.5 mm LED pair was fixed outside the shuttle box with the beam aimed at the center of the platform to detect the rat's presence. Blocking of infrared light beams was detected with Arduino (Arduino), which sent timestamps at 1 kHz to the electrophysiological recording system.

### **Experimental design**

All behavioral procedures were performed during the light phase (8 a.m. to 6 p.m.) in a temperature-controlled ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) dark room (0 lux). After surgery recovery, animals underwent food restriction (~20 g of chow biscuits per day) to 90% of body weight. Animals were habituated to the behavioral apparatus, the reward, and the platform for 30 min on one day and to the conditioned stimulus on the following day (Fig. 1A). All animals consumed the reward during habituation.

The present experimental design is a merge of the learned safety (*versus* learned fear) (Pollak et al., 2010a) and the platform-mediated avoidance (Bravo-Rivera et al., 2014; Diehl et al., 2019) protocols adapted for a within-subject investigation (Fig. 1A-D). Each day consisted of a conditioning session (Fig. 1C), followed by an approach-avoidance (AA) test (Fig. 1D). On the initial days, we conditioned a signal to the absence (safety) of aversive stimuli and, on the following days, to the anticipation (fear) of them. Then, to reveal these associations, we expected that the safety signal would increase approach to the reward, while the fear signal would increase avoidance to the safe platform in the AA test (Fig. 1C-D).

The conditioned stimulus (CS) was a LED light (200 lux) of 20 s. the aversive unconditioned stimulus (US) was an oscillating footshock of 0.6 mA during conditioning sessions and 0.8 mA in the AA test. All shocks were concomitant to a sound stimulus



**Figure 1.** Differential conditioning of the same stimulus to safety or fear promotes approach or avoidance in a within-subject design. **A**, Experimental design. Chronically implanted animals are food-restricted and submitted to days of safety and then fear conditioning and testing. **B**, Contingencies between conditioned stimulus (CS) and shocks for safety and fear conditioning. In the safety protocol, shocks and CS were presented separately, while in the fear protocol the CS always preceded escapable shocks. **C-D**, Graphical representation of behavioral results in the safety (upper) and fear (lower) protocols of conditioning (**C**) and test (**D**). **E**, Constant average escape latencies to shocks throughout conditioning sessions. **F**, CS- suppresses avoidance attempts, and CS+ increases them in conditioning sessions. **G-H**, Safety conditioning promotes higher probabilities of approach and time on reward, while reversal to fear gradually increases the probabilities of avoidance and time on platform in the approach-avoidance test. CS = conditioned stimulus; ISI = interstimulus interval. \* $p < 0.05$  (Fisher's LSD test).

(60 dB tone). During conditioning, shocks were escapable and would terminate when the rat crossed between compartments or after 30 s. During AA test, shocks had a fixed duration of 2 s and could be avoided by standing on the platform.

On the first 3-5 days, the CS was conditioned and tested for safety (CS-) by explicitly unpairing it with the US. In the safety protocol, the interstimulus interval (ISI)

was random in the range of  $20 \pm 10$  s. The US and CS were presented 4 times each for 10 times (40 trials) during conditioning and 25 times (100 trials) in the AA test (Fig. 1B). After the last safety session, there was a reversal of the CS association. On the 3-5 following days, the CS was conditioned and tested for fear (CS+). In the fear protocol, the CS preceded and accompanied every US, followed by a  $40 \pm 20$  s ISI. The CS-US pairings were presented 40 times during conditioning and 100 times in the AA test (Fig. 1B). After each conditioning session, the wall was removed, and the reward and platform were inserted. The reward compartment was blocked until the start of the AA test after 15 min (Fig. 1C-D).

We quantified the shock escape latencies and the number of crossings during and out of CS (avoidance attempts) in the conditioning sessions. In the AA test, we recorded the crossings to the reward compartment (approach) and to the platform compartment (avoidance). Then, we quantified the probability of these behavioral responses during CS (number of responses during CS/total number). We also measured the time spent in the reward and on the platform and the probability of time spent in these locations during CS (time spent in local during CS/total time spent in local).

### **Extracellular recordings**

Electrophysiological signals were recorded during conditioning and test sessions, interrupted only during footshocks by a relay system. A multichannel acquisition processor (Plexon) was used to record local field potentials (LFP) with the following parameters: 1000x gain, 0.7-500 Hz band-pass filter, 1 kHz sampling rate. Timestamps were acquired from the behavioral apparatus at 40 kHz sampling.

### **Histology**

After the last session, animals were euthanized with CO<sub>2</sub> asphyxiation, and electrolytic lesion currents (1 mA) were applied between pairs of wires. After decapitation, each brain was immersed into 4% paraformaldehyde overnight (PFA, -20 °C), followed by 70% ethanol and paraffin for coronal sectioning at the microtome. Standard cresyl-violet staining was used to validate electrode positioning under the bright-field microscope. Verification of electrode placements will be performed before formal submission of this manuscript.

## **Data analysis**

Signal processing and analysis of electrophysiological data were performed using custom scripts in MATLAB.

### *Local field potentials*

LFPs were epoched in 1-s segments with no overlap (Fig. 2C). Epochs with LFP noise (above 0.5 mV) in any region (except the DH) were detected for exclusion. Then, the whole signals were band-pass filtered (1-250 Hz) and concatenated (Fig. 2D). For CS analysis, we analyzed the epochs between 1 s and 19 s following CS onset to avoid event-related potentials and shock onset noise. For approach-avoidance (AA) analysis, we analyzed the epochs between 10 s and 1 s before crossings (approach or avoidance). For AA analysis around crossings, we also included 1 s after events. We only considered epochs when the rat was in the opposite compartment prior to each approach (platform side) or avoidance (reward side).

For each epoch, we used the multi-taper method with 5 tapers and time-half bandwidth of 3 to obtain spectral estimates of regional power and cross-regional mean phase coherence and mean phase difference. We modified scripts from the Chronux toolbox (Mitra and Bokil, 2009) to obtain coherence estimates equivalent to the phase-locking index described in Lachaux et al. (1999) rather than the magnitude squared coherence because we intended to consider only the time relationships between signals. The phase difference was interpreted as the estimate of directionality between signals (Fig. 2D). We calculated spectral data between 1 and 50 Hz using 1024 points for the Fourier transform (50 bins).

## **Multivariate analysis and decoding models**

### *Decoding pipeline*

We developed a decoding pipeline to evaluate how different features of oscillatory activity could classify CS+ *versus* CS- (fear *versus* safety) or preceding approach (AP) *versus* avoidance (AV) (Fig. 2). The features of interest were: estimate (power, coherence, and directionality); region(s); frequency bin(s); univariate value(s) or multivariate score(s). After selecting the features, each variable was Z-scored throughout epochs of interest, and binary decoder models were generated.

We estimated the binary classification accuracies of the models' scores by the area under the receiver operating characteristics curve (AUC-ROC) for each rat. We compared models between features, types, to *chance* (model trained on correct labels but tested on shuffled labels) or to *shuffled* (model trained on shuffled labels and tested on correct labels). Chance and shuffled accuracies were estimated by the average of 10 randomly shuffling labels.

#### *Linear model*

The main decoding pipeline used here was a linear model (LM) implemented with the following steps: 1) Feature(s)/attribute(s) selection; 2) Z-score transform based on train data average and standard deviation; 3) Dimensionality reduction through principal component analysis (PCA) using singular-value decomposition algorithm to the first 20 principal components (PC) unless stated otherwise; 4) Fit of a generalized linear model (GLM) with a binomial distribution and a logit link function (logistic regression) on PC scores (Fig. 2E, F, I, K). Except for specific investigations, we trained decoder models on all regions, frequencies, and estimates in each rat.

For some analyses, we fitted the GLM on the univariate Z-scored data (UV) rather than on PC scores. For decoding states from all individuals simultaneously (electome analysis), we Z-scored each subject prior to model training on all rats. The dot product between GLM coefficients and PC coefficients returned the LM coefficients to each variable, reflecting its weight and contribution to the model.

We examined the dependence of decoding performance on the association between CS to either fear or safety by training the models to discriminate CSs between two sessions for every pair of days. Then, we compared the average accuracies between CS+ vs. CS-, CS+ vs. CS+ and CS- vs. CS-.

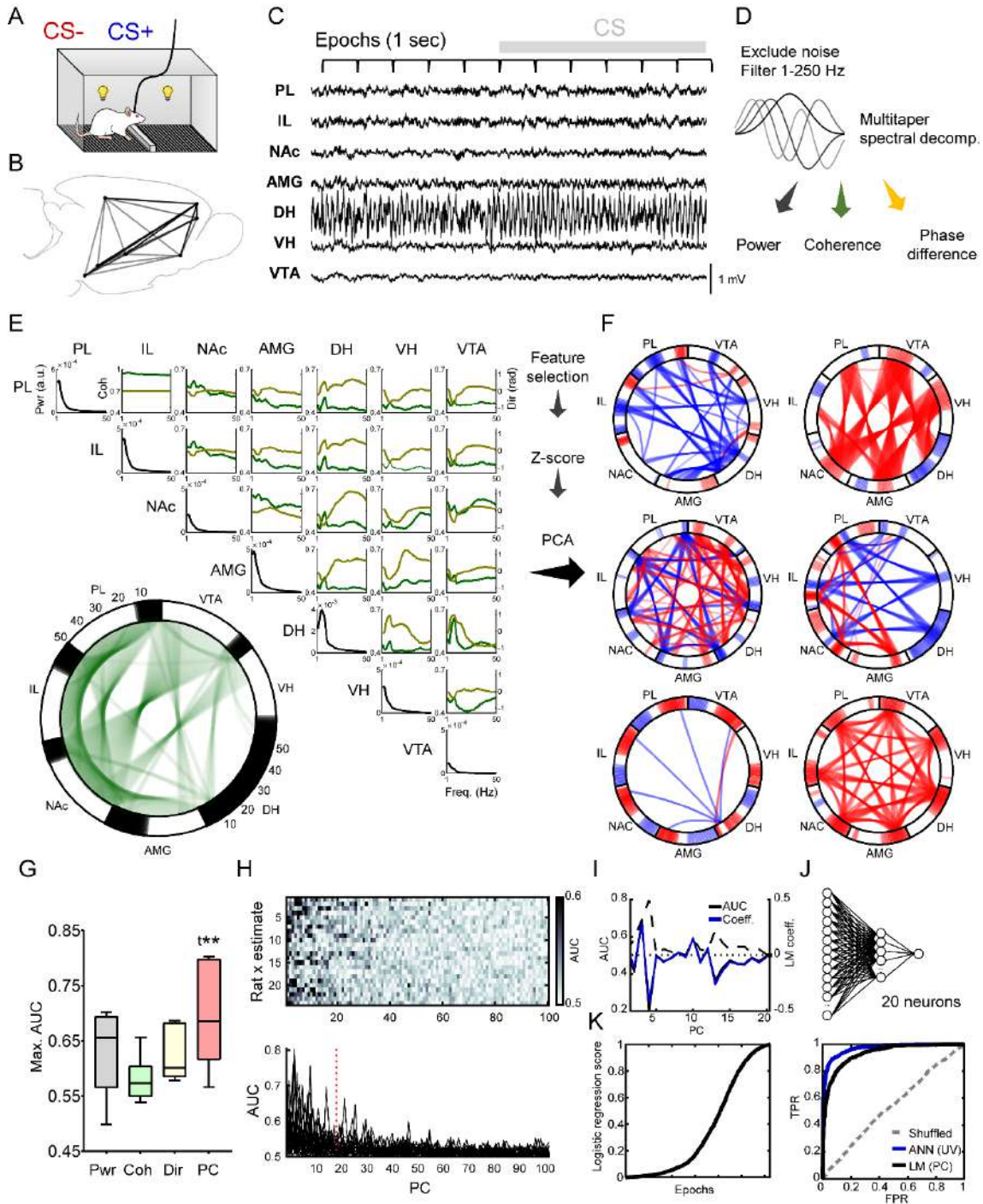
#### *Decoding by region and estimate*

To evaluate the performance of a single region, we used the LM on power (of that region), coherence, or directionality (between that region and every other; 6 pairs). To examine how decoding performance was related to the number of regions included in the model, we used whole-spectrum power, coherence, and directionality within all possible combinations of specified numbers of regions (from 1 to 7).

#### *Decoding by frequency*



To evaluate the decoding performance of specific frequencies, instead of fitting the LM against the whole spectrum (50 bins), we fitted it against each frequency bin (1 bin). Because the number of variables for each bin (up to 7 power, 21 coherence and 21 directionality) was, sometimes close to the number of PCs used for other analyses (20), we calculated a curve for every cumulative number of PCs from 1 to 20 (PC1,



**Figure 2.** Decoding pipeline. **A**, Graphical representation of freely moving electrophysiological recordings during CS- and CS+. **B**, Sagittal representation of brain-wide distributed implant coordinates. **C**, Representative traces of multi-site local field potentials during CS+. **D**, Preprocessing steps and multitaper estimation of spectral power, coherence, and phase difference/directionality. **E**, Example of CS+ average raw power (diagonal, black line), coherence (green line), and directionality (yellow line; phase difference) across all regions and pairs of one rat. Network chord diagram (bottom left) showing power (black lines in outer contours) and coherence (green lines within circle) estimates (above a threshold) across frequencies (counterclockwise ascending). **F**, After feature selection, the multidimensional spectral estimates are Z-scored and dimensionality-reduced through PCA. Examples of principal components (PC) of different rats. PC coefficients (red = positive; blue = negative) demonstrate brain-wide network collective variations. **G**, The average maximum area under the curve (AUC) for CS+/CS- classification by PC scores (from power, coherence, and directionality combined) is greater than by each univariate estimate.  $p = 0.058$ ,  $*p < 0.05$  (Fisher's LSD test). **H**, Greater values of AUC occur until the 20th PC for all rats and estimates. **I**, Example of generalized linear model (LM) coefficients corresponding to PCs' AUCs in one rat. **J**, An artificial neural network with one hidden layer of 20 neurons was also used. **K**, Example of LM scores of one rat and its ROC curve (TPR = true positive rate; FPR = false positive rate) compared to shuffled test labels and ANN. Here and on: PL = prelimbic area; IL = infralimbic area; NAc = nucleus accumbens; AMG = amygdala; DH = dorsal hippocampus; VH = ventral hippocampus; VTA = ventral tegmental area.

PC1 to PC2, PC1 to Nth PC, until PC1 to PC20). For region x frequency decoding, we fitted the LM on UV data because it had only 13 attributes (1 power, 6 coherence and 6 directionality). We compared the rats' average AUC across cumulative PCs between frequency ranges (theta: 4-10 Hz; no-theta: 1-4 plus 10-50 Hz) and the proportions of maximum AUC within frequency ranges across all PCs of all rats (N = 120).

### *Generalization*

To estimate within-subject generalization (test performances) of decoder models, we trained a model on data from the Nth day (1st, 2nd, 3rd, and on) of safety versus the Nth day of the fear protocol and performed out-of-sample testing on every remaining Nth pair of days. Then, we obtained the average of test accuracies for all Nth days trained and tested. For AA, we trained the model on each session and tested it on all others, irrespective of the protocol. To estimate between-subject generalization, we trained the model on all epochs of a single subject and averaged the test accuracies on all other subjects.

### *Artificial neural network*

We also used a shallow artificial neural network (ANN) consisting of a single hidden layer with 20 neurons with sigmoid transfer function and 1 output neuron with softmax transfer function. Each ANN was trained using symmetric random weight/bias initialization and updates according to the scaled gradient conjugate method, 70/30% train/test data divided randomly, and cross-entropy performance error estimate. Training would stop after 6 subsequent iterations with increases of validation error. We

trained the ANN 10 times and selected the one with the highest performance. The ANN were trained only on UV.

#### *Individual variability*

To visualize the dispersion of spectral data across individuals and stress-related states, we used two-dimensional t-distribution stochastic neighbor embedding (t-SNE) of the first 20 PCs of Z-scored data (across subjects) with the following parameters: Barnes-Hut algorithm with 0.5 tradeoff parameter, Euclidean distance, exaggeration size of 4, perplexity of 30 local neighbors, and normally distributed random ( $\times 10^{-4}$ ) initialization. We clustered t-SNE data with k-means using squared Euclidean distances, 1000 replicates, and 1000 maximum number of iterations. To estimate within- and between-subject variance, we computed the mean squared Euclidean distance of the first 20 PCs of Z-scored data across all epochs of interest of each subject and the average between each rat to all others, respectively.

#### **Statistical analyses**

We used paired Student t-test for within-subject comparisons and multiple t-tests for frequency-wise comparisons. We used repeated measures (RM) one-way analysis of variance (ANOVA) for comparisons between features or models and RM two-way ANOVA for two features or across time (days or seconds), and Fisher's least significant difference (LSD) test as *post hoc* analysis. We performed mixed-effects models using the restricted maximum likelihood method for RM ANOVA with missing values. We examined the trend relationship of variables with time or number of regions using linear or nonlinear (x as log and y as linear) regression and F-test for nonzero slope. The chi-squared test was used to compare the proportions of maximum AUC within and out of theta range. Normality was assessed using the Lilliefors test. We calculated Pearson's correlation between normal distributions and Spearman's rank correlation as a non-parametric equivalent. Data are expressed as the median, second-third quartiles range, and multiple significances are expressed as the minimum-maximum range. The significance level was set to 0.05 unless stated otherwise.

#### **Results**

## Differential conditioning to safety or fear promotes approach or avoidance in a within-subject design

To investigate how multiple brain structures encode fear or safety and approach (AP) or avoidance (AV) we recorded LFP from seven regions of the mesolimbic-hippocampal-frontocortical network (MLHFC; Fig. 2B-C) in a newly developed protocol that delineates such behavioral states. Here, a conditioned stimulus (CS) was associated with safety (CS-; absence of shocks) in the initial days and then to fear (CS+; anticipation of shocks), and these associations were tested in an approach-avoidance (AA) test daily (Fig. 1A-D).

Initially, we confirmed that all rats performed the escape response to the US throughout sessions irrespective of CS association (mixed-effects RM one-way ANOVA: session  $F(9,37) = 1.48$ ,  $p = 0.18$ ; Fig. 1E). In turn, we observed greater probabilities of avoidance attempts out of CS- and during CS+ throughout sessions (Fig. 1F) and on average ( $t(5) = 18.67$ ,  $p < 0.0001$ ), indicating the differential association with safety and fear, respectively. In the AA test, we expected that CS-conditioning would increase the probabilities of approach and time spent on reward during CS, while the CS+ would promote the opposite effect and increase the probabilities of avoidance and time on platform (Fig. 1D). Indeed, we observed a learning curve of the probabilities of approach *versus* avoidance from the start of safety conditioning and after reversal to fear (mixed-effects RM two-way ANOVA: session x behavior interaction  $F(9,32) = 8.78$ ,  $p < 0.0001$ ; Fig. 1G). In accordance, we only found significant differences between probabilities of AP vs. AV after the second day, which remained until the last safety session ( $t(36) = 2.65-4.59$ ,  $p = 5.1 \times 10^{-5}-0.01$ ; Fig. 1G). In turn, there was no difference on the following days after reversal except for the third fear session onwards ( $t(df) = 2.29-3.83$ ,  $p = 0.0004-0.02$ ; Fig. 1G). A similar pattern was found for the probabilities of time spent in reward versus on platform (RM mixed-effects model: session x behavior interaction  $F(9,32) = 5.50$ ,  $p = 0.0001$ ), as the probability of time on reward was significantly greater after the second day until the last safety session ( $t(36) = 2.77-4.49$ ,  $p = 7.0 \times 10^{-5}-0.008$ ; Fig. 1H). Taking the average of all sessions, there were significant increases in the probabilities of avoidance ( $t(4) = 3.57$ ,  $p = 0.02$ ) and time on platform ( $t(4) = 5.80$ ,  $p = 0.004$ ) during CS+ than CS-. Although there were no significant differences on average, the probabilities of

approach ( $t(4) = 4.69, p = 0.009$ ) and time on reward ( $t(4) = 2.35, p = 0.07$ ) during CS were greater on the last session of safety than fear (Fig. 1G-H).

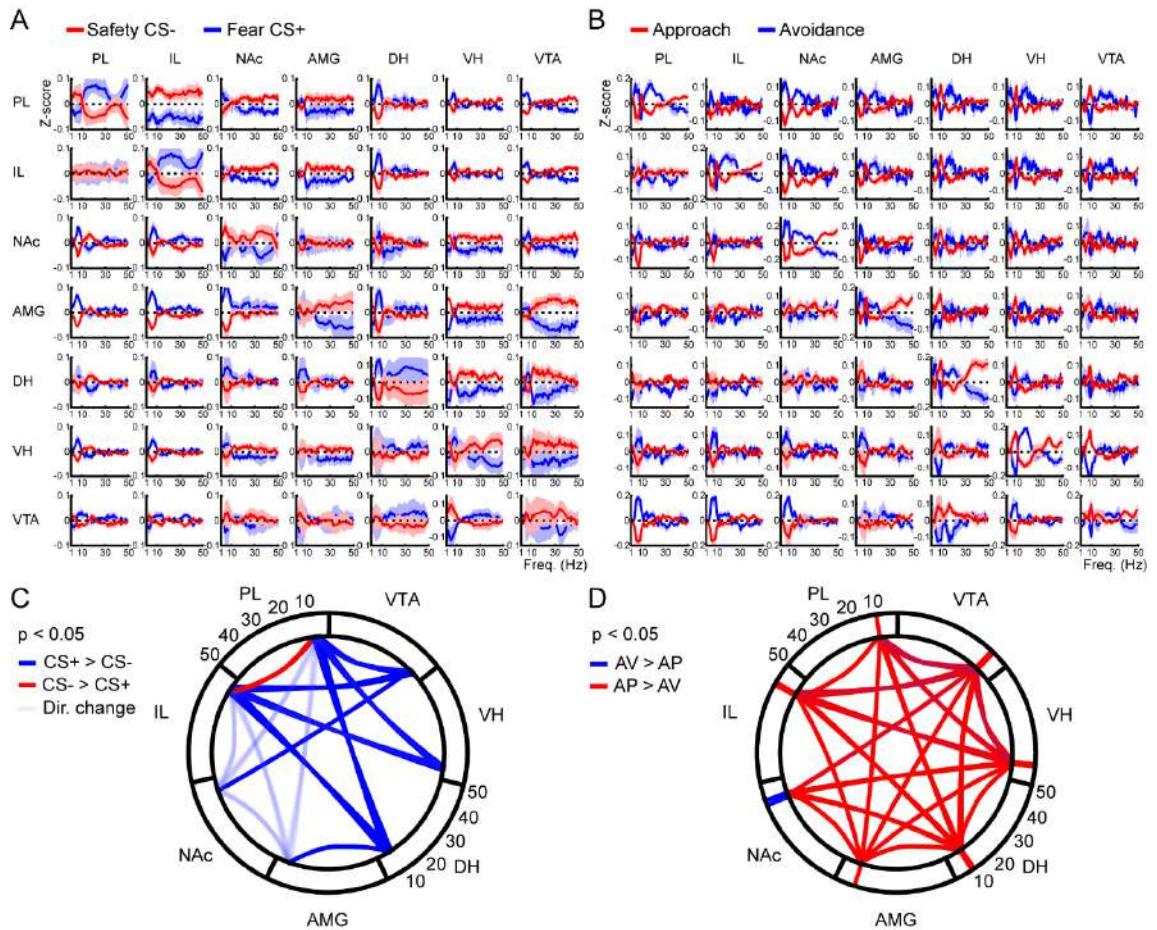
In conclusion, this new experimental design was able to promote a differential conditioning to safety and fear, as expressed by the probabilities of approach and avoidance during CS on test sessions. Thus, this proves to be an appropriate behavioral protocol to investigate neural activities and within-subject decoding of fear, safety, approach and avoidance states.

### **Increased mesolimbic-hippocampal-prefrontal cortical theta activity in fear and approach**

Previous studies indicated the involvement of theta oscillations in the processing of fear and anxiety. Before investigating the multivariate decoder models, we examined the participation of theta activity during fear versus safety and in the prediction of approach or avoidance through common univariate analysis.

Notably, we observed a clear differentiation between stress-related states within the theta range (Fig. 3). For CS+/CS-, it preferentially occurred within 5-9 Hz (Fig. 3A) and, for AA, within 8-11 Hz (Fig. 3B). By frequency-wise comparisons, we found that CS+ was associated with increased theta coherence ( $t(4) = 2.24-5.94, p = 5.10 \times 10^{-6}-0.049$ ) in a tegmental-hippocampal-frontocortical subnetwork (PL-[DH, VH, VTA]; IL-[DH, VH, VTA]) with lower values between VTA-NAc and DH-AMG (Fig. 3C). In addition, we found changes in directionality ( $t(4) = 2.34-11.95, p = 3.01 \times 10^{-7}-0.049$ ) in a limbic-frontocortical subnetwork (PL-[NAc, AMG], IL-[NAc, AMG]) rather than coherence (Fig. 3C).

In the AA sessions, we found a remarkable increase in theta power and coherence on the periods preceding AP, compared to AV (Fig. 3B). These increases were significant (power:  $t(4) = 2.40-5.49, p = 2.70 \times 10^{-5}-0.049$ ; coherence:  $t(4) = 2.35-9.80, p = 6.11 \times 10^{-7}-0.05$ ) for almost all regions and pairs of regions (except PL- and IL-NAc; Fig. 3D). In addition, we found changes in directionality in the tegmental-hippocampal-frontocortical subnetwork that differentiated AP and AV ( $t(4) = 2.34-5.22, p = 4.12 \times 10^{-5}-0.049$ ; Fig. 3D). Surprisingly, only the NAc showed greater power in the periods preceding AV, but looking at the spectrum (Fig. 3B, D), this difference was due to overall effects on the whole-spectrum rather than specifically in theta. In fact, we



**Figure 3.** Increased mesolimbic-hippocampal-prefrontal cortical theta activity in fear and approach. **A-B**, Average comparisons of Z-score transformed spectral estimates. Diagonal panels show power, upper right panels show coherence, and lower left panels show directionality (phase difference between y-axis region minus x-axis region) comparisons. **C-D**, Significant differences (t-tests  $p < 0.05$ ) within theta ranges for **(C)** CS+/CS- (5-9 Hz) and **(D)** approach (AP) and avoidance (AV) (8-11 Hz).

also noticed some differences beyond theta in some pairs of regions (Fig. 3B), suggesting activities in other frequencies may also be involved.

Our findings corroborate previous evidence for the association between increased limbic-cortical theta power and coherence in fear and directionality changes associated with safety. However, we found stronger theta power and synchrony preceding approach rather than avoidance. In addition, we showed that the relationship between theta activity and stress coping happens at multiple regions comprising a brain-wide network.

### Brain-wide power, synchrony and directionality decode fear or safety better than each region separately

To explore how different sets of features of oscillatory activity can decode fear or safety, we developed a linear decoding pipeline. Importantly, our behavioral protocol and signal quality criteria were able to provide a proper (CS- = 2066, 1877-2979; CS+ = 1994, 1247-2596; AP = 457, 425-1341; AV = 457, 350-1076) and balanced (CS+/CS- = 48.99%, 43.36-51.35%; AV/AP = 45.25%, 42.10-47.89%) amount of epochs per rat for classification. First, we realized that by choosing different features, the numbers of variables would change. For example, taking the whole spectrum (50 frequency bins) of all regions (7 regions, 21 pairs) and estimates (power, coherence, direction) would comprise 2450 attributes (Fig. 2E), while taking the power of a single region would contain only 50 attributes. Because classification models are dependent on the number of attributes/variables included, we performed dimensionality reduction to a fixed number of multivariate scores, and then we fitted a generalized linear model.

We attempted several methods of dimensionality reduction (e.g., factor analysis, hierarchical clustering, non-negative matrix factorization) and chose PCA because it is the most standard, faster and interpretable method. PCs are linear combinations of correlated data. Therefore, in our data, they reveal collective variations of spectral estimates across regions and frequencies, as illustrated by representative PCs' coefficients of power and coherence (Fig. 2F), indicating that these scores represent network activities. In contrast, PCs are uncorrelated to each other, so it avoids multicollinearity. Moreover, PCs are ordered by the amount of variance they explain, so the number of PCs for proper decoding can also reveal biological information.

We found that, on average, the best PC (from all estimates combined) had a greater AUC than the best UV variable (across all frequencies, regions and pairs; RM one-way ANOVA  $F(3,15) = 4.70$ ,  $p = 0.01$ ; Fig. 2G) for power ( $t(15) = 2.04$ ,  $p = 0.058$ ), coherence ( $t(15) = 3.71$ ,  $p = 0.002$ ), and directionality ( $t(15) = 2.34$ ,  $p = 0.03$ ), confirming that these multivariate scores contain relevant information for stress-related decoding. Then, we observed that most of the relevant ( $AUC > 0.60$ ) PCs (for power, coherence, directionality, and all estimates combined) for discriminating fear vs. safety occurred until the 20th PC (Fig. 2H), so we heuristically determined this number to evaluate decoding performances throughout this study. Importantly, the number of epochs for each rat was several times greater than this number of PC scores used for GLM regression, which also aided in avoiding overfitting. In fact, we observed that GLM

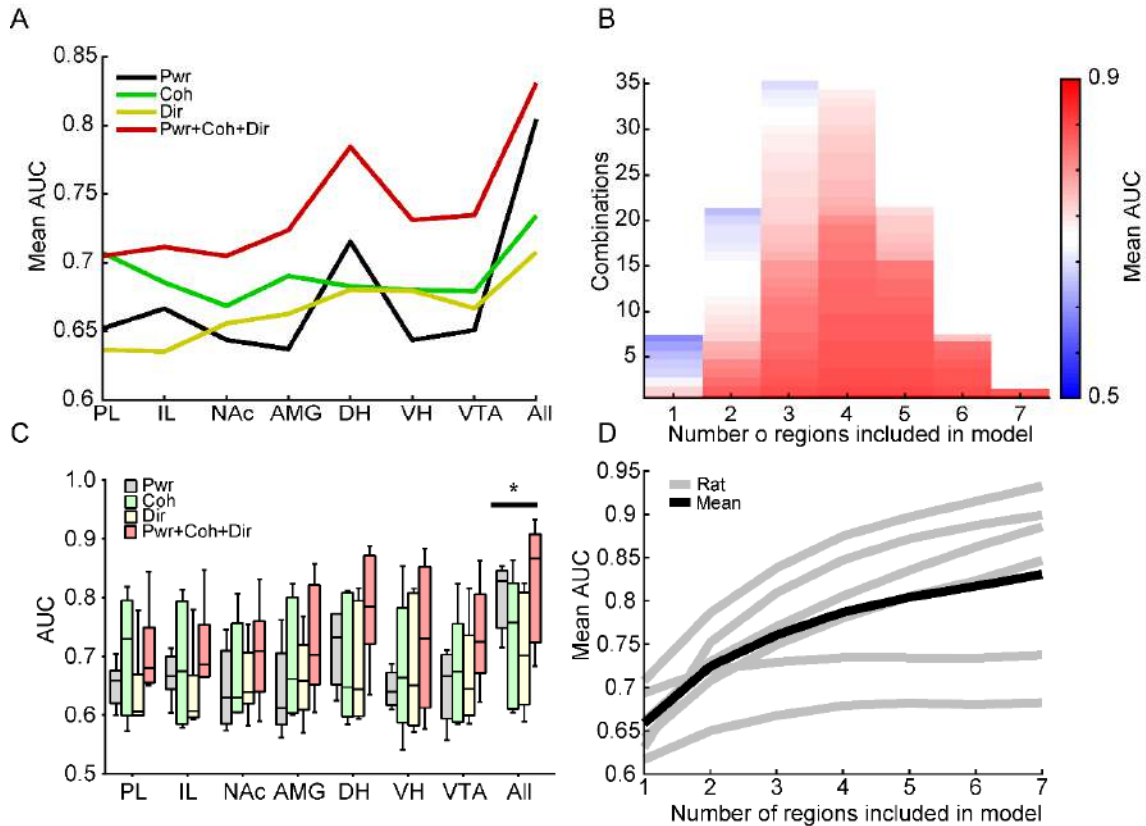
coefficients closely corresponded to each PC AUC (see example in Fig. 2), also suggesting a lack of overfitting.

Having established a decoding pipeline that avoids the bias of the number of attributes, we set out to investigate how the activity of different sets of multiple brain structures and spectral estimates can decode fear or safety. First, we investigated how each region and estimate (local power, coherence, and directionality to all other regions) would classify fear or safety. We found that every region and estimate showed a greater AUC than the models trained on shuffled labels ( $t(5) = 2.97-12.26$ ,  $p = 6.37 \times 10^{-5}-0.03$ ; not shown). Then, we also computed the model considering all regions simultaneously, and found that the decoding performance, considering each estimate and all estimates combined, was greater than each region separately (RM two-way ANOVA region  $F(7,35) = 3.84$ ,  $p = 0.003$ ; *post hoc*:  $t(35) = 2-19-4.14$ ,  $p = 0.0002-0.003$ ; Fig. 4A, C). We also found a significant interaction between region and estimate (RM two-way ANOVA region x estimate interaction  $F(21,105) = 2.00$ ,  $p = 0.01$ ; Fig. 4C). In particular, we noticed that the DH showed greater performance than other regions (Fig. 4A, C). Indeed, all regions-all estimates models showed significant difference to every separate region ( $t(105) = 4.05-5.31$ ,  $p < 0.0001$ ), but only a tendency against the DH ( $t(105) = 1.95$ ,  $p = 0.053$ ).

Next, we investigated the relationship between decoding performance and the number of regions included in the model. We calculated the AUC of models from all possible combinations of regions and their power-coherence-directionality values (Fig. 4B). We found that the average decoding accuracy increased as a function of the number of regions included in the model (number of regions x mean AUC linear regression:  $r(5)^2 = 0.90$ ,  $F(1,5) = 47.31$ ,  $p = 9.93 \times 10^{-4}$ ; nonlinear regression:  $r(5)^2 = 0.99$ ,  $F(1,5) = 82207$ ,  $p < 1 \times 10^{-10}$ ), reaching the highest performance if all regions were included (Fig. 4D). Remarkably, all rats showed this same pattern (linear regression:  $r(5)^2 = 0.67-0.96$ ,  $F(1,5) = 10.21-138.73$ ,  $p = 7.76 \times 10^{-5}-0.01-0.02$ ; nonlinear regression:  $r(5)^2 = 0.88-0.99$ ,  $F(1,5) = 3630-75252$ ,  $p = 1 \times 10^{-10}-2.38 \times 10^{-8}$ ; Fig. 4D).

We conclude that, although some regions and estimates may show greater relevance for decoding fear or safety, such as the DH, the best classification performances are achieved if all regions and estimates are included for the model generation. Our results evidence that fear and safety are encoded at the brain-wide





**Figure 4.** Brain-wide power, synchrony, and directionality decode fear or safety better than each region separately. **A, C**, AUC of each region and respective estimates show better performance if all regions and estimates are considered together. \* $p < 0.05$  (Fisher's LSD test for comparisons between regions; all vs. every region). Note the particularly good decoding of the DH. **B**, Ranked AUC from all possible combinations of regions in ascending order. **D**, Average decoding performance increases as a function of the number of regions included. This pattern is similar for all rats. Here and on: box plots represent the median and interquartile range, and whiskers represent minimum and maximum across rats.

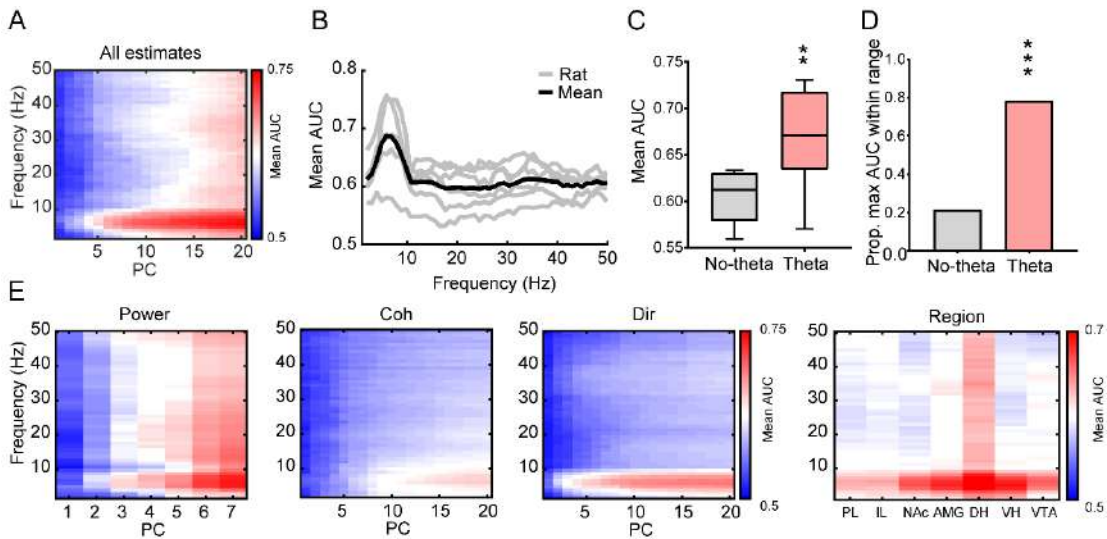
level, as represented by patterns of collective variations across multiple regions simultaneously.

### Patterns of brain-wide theta activity decode fear or safety better than other frequencies

After showing that whole-spectrum data can decode fear or safety, we sought to investigate what frequencies were the most relevant. We estimated the decoding performance for every frequency across cumulative numbers of PCs. Because PCs are ranked by the proportion of data variance they explain, we hypothesized that the frequencies where variation was more related to fear vs. safety would show a good performance already on more initial PCs. From the average PC x frequency

classification, we noticed markedly greater accuracies within 4-10 Hz, which started already at the first 5 PCs (Fig. 5A). Indeed, the averaged accuracies within theta were significantly greater than non-theta frequencies ( $t(5) = 4.32$ ,  $p = 0.007$ ; Fig. 5B-C) and the proportion of maximum AUCs within theta ( $N = 94/120$ , 78.33%) was significantly greater than out of theta ( $X^2(1, N = 120) = 77.07$ ,  $p < 0.0001$ ; Fig. 5D). Moreover, we observed that theta frequencies showed average greater performances for all estimates (Fig. 5A), power, coherence, directionality, and every region (Fig. 5E).

In conclusion, we show that theta network activity is the most relevant for decoding fear or safety. These findings corroborate previous reports, but demonstrate that all regions and estimates are relevant for this performance, indicating a complex network activity involving amplitude, synchrony, directionality and multiple regions simultaneously. Also, such a preference of the decoder model to these specific frequencies validates the physiological relevance of the algorithm used.

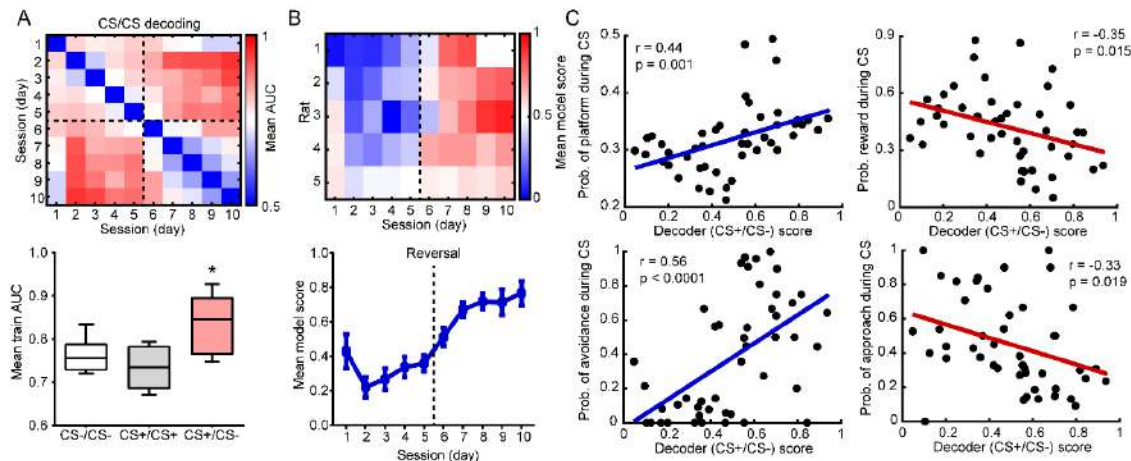


**Figure 5.** Patterns of brain-wide theta activity decode fear or safety better than other frequencies. **A-D**, Brain-wide power, coherence, and directionality collectively shows greater decoding performances within the theta frequencies. Note good decoding in the theta range with fewer PCs. Theta frequencies show significantly greater **(C)** AUC (paired t-test  $**p < 0.01$ ) and **(D)** proportion of maximum AUC across all rats and PCs (chi-squared test  $***p < 0.0001$ ) than other frequencies. **E**, The better decoding of theta frequencies happens separately for power, coherence, directionality, and every region.

### Decoding CS association to safety or fear predicts approach or avoidance

To investigate if decoder performances were associated with CS association to fear or safety, first, we examined the model accuracies trained between CSs from all

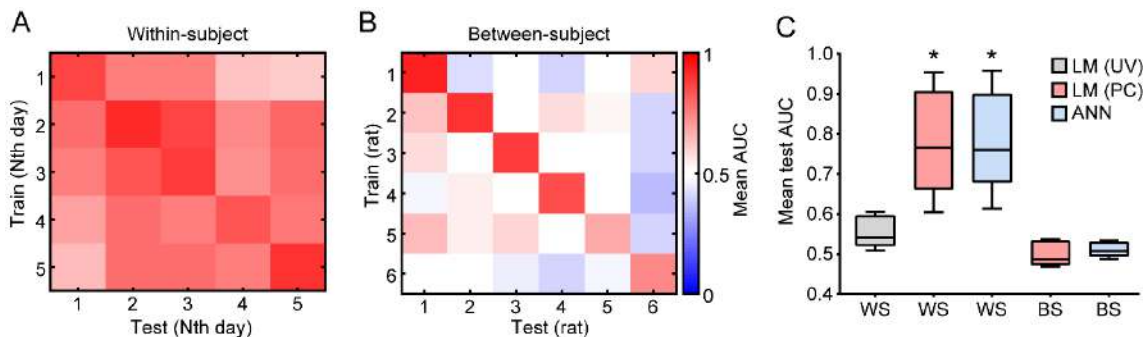
sessions. We observed that the accuracies were better when decoding CS+ vs. CS- (RM one-way ANOVA  $F(2,10) = 9.76$ ,  $p = 0.004$ ) than CS- vs. CS- ( $t(10) = 3.12$ ,  $p = 0.01$ ) or CS+ vs. CS+ ( $t(10) = 4.26$ ,  $p = 0.001$ ; Fig. 6A). This finding demonstrates a greater dependence of decoding performance to CS association than to inherent variability across days. Then, we noticed that decoder scores, trained on all data of each individual, did not return a homogeneous distribution across sessions, but rather, it exhibited a dynamics (mixed-effects RM one-way ANOVA  $F(9,37) = 10.27$ ,  $p < 0.0001$ ; Fig. 6B). We observed from the averaged scores a poor decoding in the first sessions of safety and fear, which was similar to the learning curve for behavioral measures of fear and safety described earlier (Fig. 6B; see also Fig. 1G-H). Therefore, we hypothesized that the decoder scores could be correlated to the behavioral measures of CS association, evaluated later on test sessions. Indeed, decoder scores (positive values for CS+) during conditioning showed positive correlations to the probabilities of avoidance ( $r(45) = 0.56$ ,  $p < 0.0001$ ) and time on platform ( $r(45) = 0.44$ ,  $p = 0.001$ ), while it showed negative correlations with the probabilities of approach ( $r(45) = -0.33$ ,  $p = 0.01$ ) and time on reward ( $r(45) = -0.35$ ,  $p = 0.01$ ) on test sessions (Fig. 6C). Thus, we conclude that CS+/CS- brain-wide decoding is dependent on the association between the CS to either fear or safety, as the decoder scores predicted behavioral manifestations of these associations.



**Figure 6.** Decoding CS association to safety or fear predicts approach or avoidance. **A**, Decoding performances across days depended on CS association. The average AUC trained between days was greater for CS- vs. CS+ than for CS+ vs. CS+ or CS- vs. CS-. \* $p < 0.05$  (Fisher's LSD test). **B**, Heterogeneous distribution of decoder scores throughout sessions. Average decoder scores resemble the learning curves of behavioral measures of fear and safety (see Figure 1). **C**, Average decoder scores of CS (CS+ = 1, CS- = 0) during conditioning positively correlated with the probabilities of avoidance and time on platform and negatively correlated with the probabilities of approach and time on reward during CS on test sessions.

### Within-subject generalization of decoder models for fear or safety

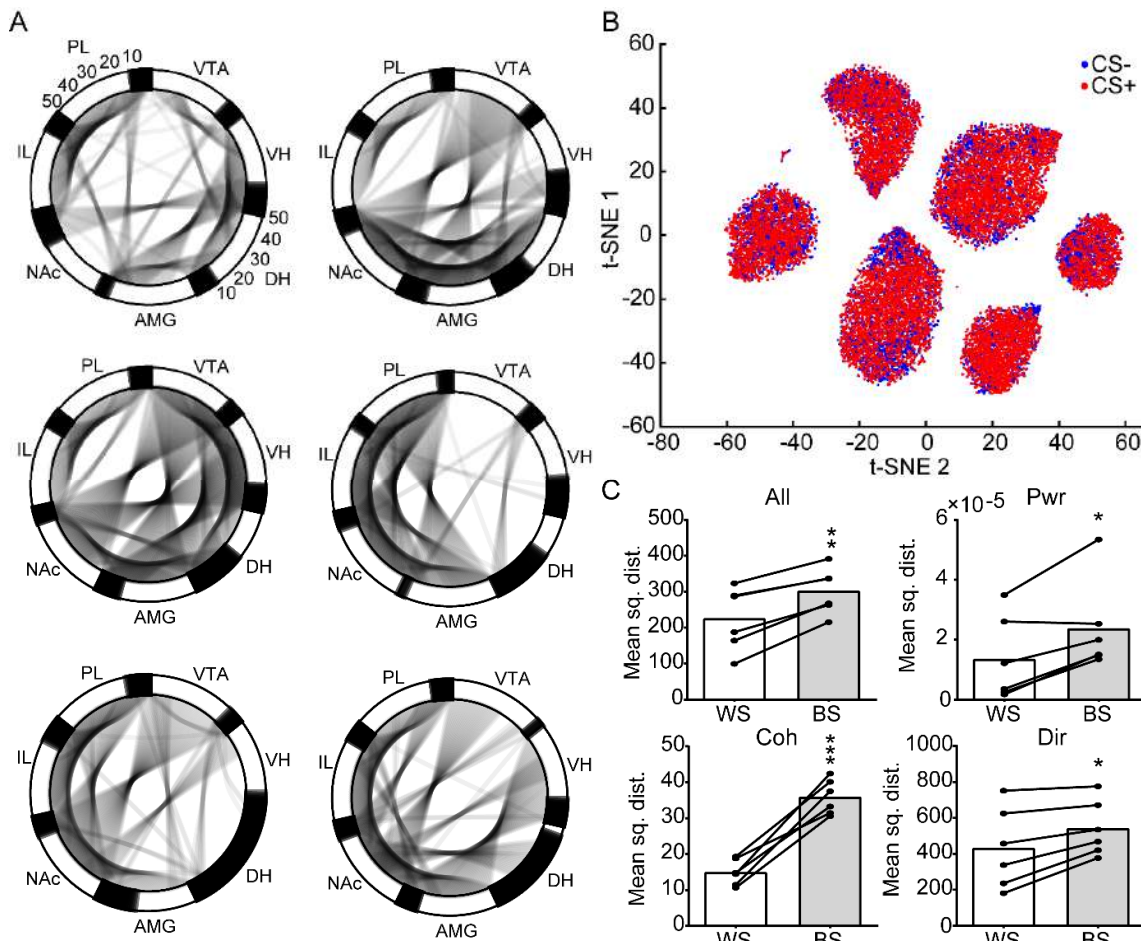
We investigated if decoder models exhibit generalization, that is, whether they perform well when tested on new unseen data. Remarkably, we observed that decoder models showed good average performances when tested on sessions they were not trained on (AUC = 0.76, 0.66-0.90; Fig. 7A). In turn, the LM trained on UV (LMUV) exhibited overfitting, as they showed excellent train (AUC = 1) but bad test (AUC = 0.54, 0.52-0.59) performances (Fig. 7C), likely because the numbers of variables and observations were close in this case. In fact, the LM trained on PCs (LMPC) showed greater test performances than the LMUV ( $t(4) = 4.58$ ,  $p = 0.01$ ; Fig. 7C). We also trained an ANN on UV, which is usually considered a gold standard classification model, and we found an equivalent generalization to the LMPC (AUC = 0.76, 0.68-0.89;  $t(4) = 0.30$ ,  $p = 0.77$ ; Fig. 7C). Next, we investigated between-subject generalization by training the model on one rat and testing on all others (Fig. 7B). Interestingly, we found a poor between-subject generalization for both LMPC (AUC = 0.48, 0.47-0.53) and ANN (AUC = 0.50, 0.49-0.53; Fig. 7B, C). In addition, the test accuracies were significantly lower than within-subject performances (LMPC:  $t(9) = 5.11$ ,  $p = 0.0006$ ; ANN:  $t(9) = 5.27$ ,  $p = 0.0005$  Fig. 7C). The better performance of within-subject compared to between-subject generalization reveals a relevant individual variability in stress processing. Also, the generalization of the LM models and the equivalent performance to ANN substantiate the validation of the decoding method.



**Figure 7.** Within-subject generalization of decoder models for fear or safety. **A, B,** Decoder models exhibited **(A)** robust within-subject generalization across days but **(B)** poor generalization between rats. **C,** The linear model (LM) trained on univariate (UV) data exhibited overfitting, while trained on PC presented a good generalization equivalent to an artificial neural network (ANN). Both LM and ANN showed poor between-subject validation. WS = within-subject; BS = between-subject. \* $p < 0.05$  (paired t-test against LMUV).

## Individual variability of invariant patterns of cross-regional synchrony

After observing such a diversity of individual variability in stress processing, we investigated how the patterns of brain-wide activity differ between individuals. We observed that there is an interindividual variability of brain power and synchrony, irrespective of stress-related states (Fig. 8A). t-SNE transform of brain-wide activity returned six well-defined clusters (Fig. 8B), which precisely corresponded to each individual rat (k-means clusters x rats:  $N = 25368/25399$  epochs, 99.88%). We also noticed from t-SNE inspection that interindividual variability is much more relevant than stress-related information, as CS+/CS- epochs showed significant overlap within each

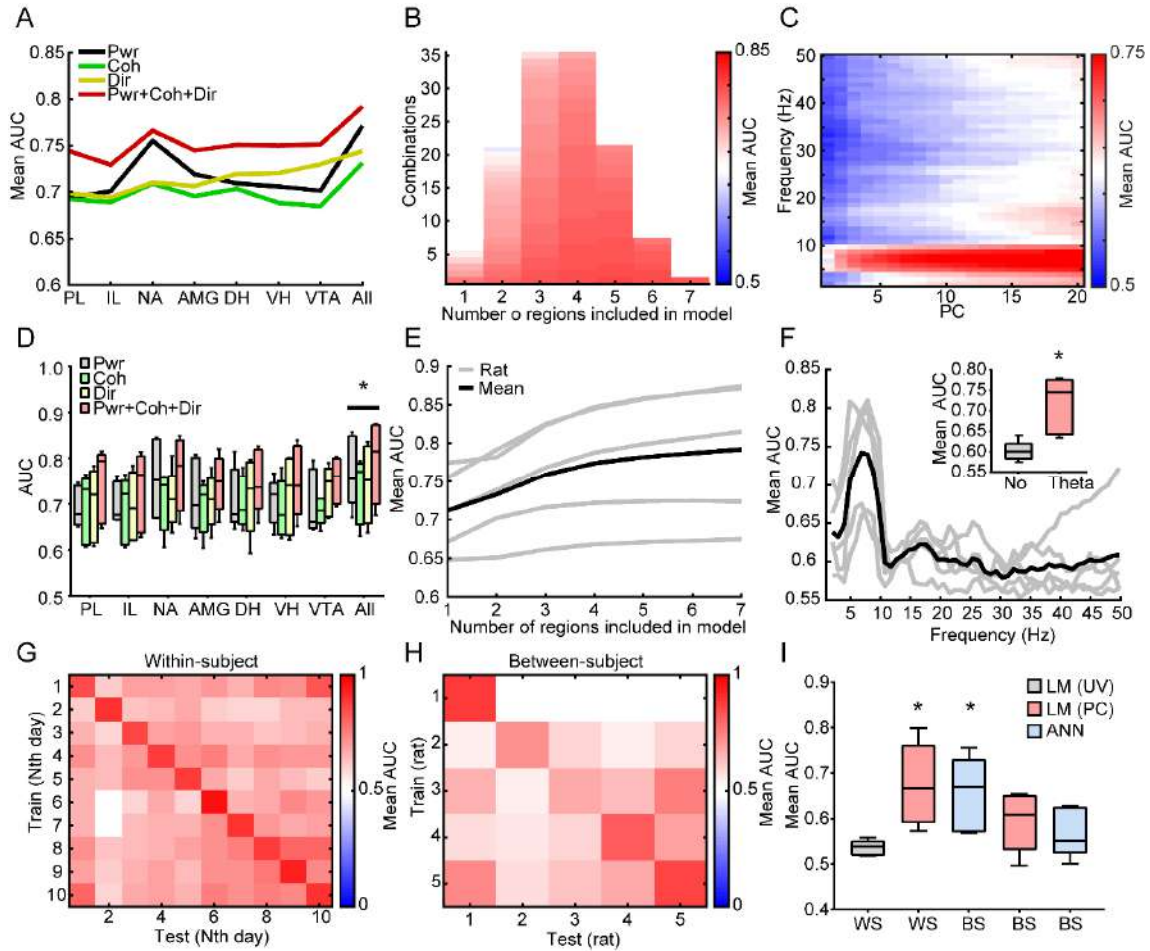


**Figure 8.** Individual variability of invariant patterns of brain synchrony. **A**, Network chord diagrams representing the average power and coherence estimates for each rat. Note the variability of whole-spectrum coherence strengths between pairs of regions across rats. Note that brain-wide synchrony resembles a small-world network configuration. **B**, Two-dimensional t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) of spectral data showing six well-defined clusters that correspond to the six rats, while CS+ and CS- clearly overlap. **C**, All estimates show greater average mean squared distances between subjects than within each. Note the more significant variances between subjects for coherence estimates. WS = within-subject; BS = between-subject. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (paired t-test).

rat cluster (Fig. 8B). We assessed further the within- and between- subject variability, measured by the mean squared distances and we confirmed a significantly greater between-subject than within-subject variance for power ( $t(5) = 3.88$ ,  $p = 0.01$ ), coherence ( $t(5) = 9.32$ ,  $p = 0.0002$ ), directionality ( $t(5) = 3.74$ ,  $p = 0.01$ ) and all estimates combined ( $t(5) = 6.67$ ,  $p = 0.001$ ; Fig. 8C). In addition, we found that coherence is the measure with the greatest interindividual variability. Therefore, our findings indicate a substantial individual variability in both stress coping-related processing and invariant brain activity.

### **Decoding approach versus avoidance reveals similar preferences for brain-wide and theta activities, and within-subject generalization**

After validating the decoding pipeline, we sought to investigate how the same method could be applied to decode AP and AV motivational states. Strikingly, AA decoding revealed similar characteristics to CS+/CS- decoding (Fig. 9). We observed greater performance from all estimates if all regions are considered rather than each one separately (RM two-way ANOVA region  $F(7,28) = 5.11$ ,  $p = 0.0007$ ;  $t(28) = 2.19$ - $5.02$ ,  $p = 2.6 \times 10^{-5}$ - $0.03$ ; Fig. 9A, D). We also observed a growing curve of the average performance as function of the number of regions included in the model (linear regression:  $r^2(5) = 0.90$ ,  $F(1,5) = 49.23$ ,  $p = 9.06 \times 10^{-4}$ ; nonlinear regression:  $r^2(5) = 0.98$ ,  $F(1,5) = 46203$ ,  $p = 4.13 \times 10^{-11}$ ; Fig. 9B, E). However, differently from CS+/CS-, the NAc showed the greatest performance, particularly for power data, which is also consistent with the univariate results (Fig. 9A, D; see also Fig. 3B). Also in agreement with the univariate analysis, the theta frequencies showed the greatest performances across the spectrum ( $t(4) = 4.40$ ,  $p = 0.01$ ; Fig. 9C, F). Interestingly, we observed a better performance for within-subject generalization (AUC = 0.66, 0.59-0.76; Fig. 9G), which was significantly greater than the LMUV overfitted model ( $t(4) = 4.20$ ,  $p = 0.01$ ; Fig. 9I), but was not significantly different from between-subject classification ( $t(4) = 1.74$ ,  $p = 0.15$ ; AUC = 0.60, 0.53-0.65; Fig. 9I). In fact, AA decoding showed a slightly greater between-subject validation than CS+/CS- (Fig. 9H-I; see also Fig. 7B, D). In conclusion, our decoding pipeline exhibits generalized applicability, since it can decode distinct dimensions of stress coping. Also, both AA and CS+/CS- decoding showed similar characteristics, supporting the preference for brain-wide, theta frequencies, and individual variability in the encoding of stress coping-related information.



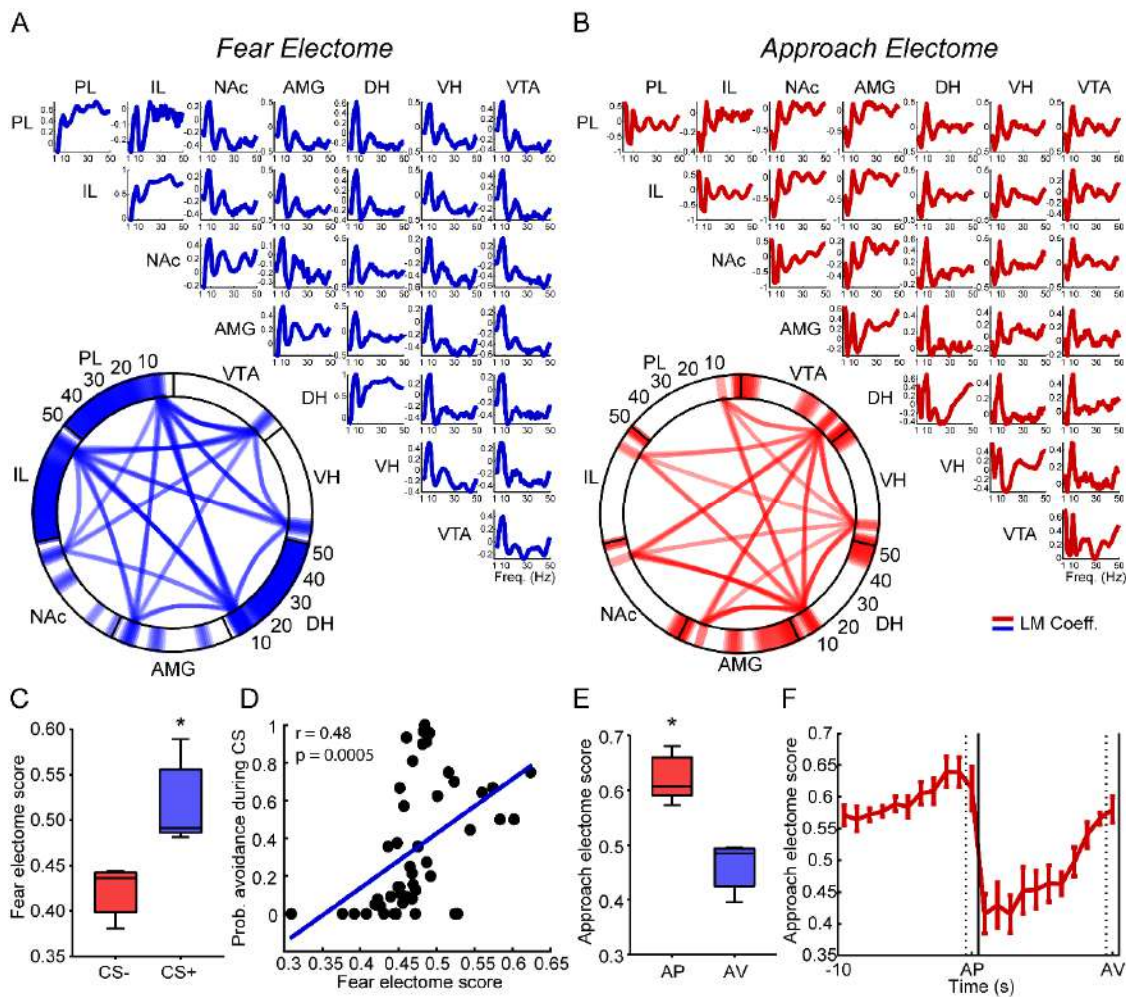
**Figure 9.** Decoding approach versus avoidance reveals similar properties to decoding fear versus safety. **A, C,** All regions and estimates combined showed greater decoding than each separately. \* $p < 0.05$  (Fisher's LSD test for comparisons between regions; all vs. every region). Note particular good decoding of the NAc. **B,** Ranked AUC from all possible combinations of regions in ascending order. **E,** Average decoding performance increases as a function of the number of regions included in all rats. **C, F,** Specifically great decoding within the theta frequencies occurred with **(C)** fewer PCs and **(F)** in all rats. \* $p < 0.05$  (paired t-test). **G-H,** Decoder models exhibited greater within-subject generalization across days than between rats. However, note a moderate performance of between-subject validation. **I,** The linear model (LM) trained on univariate (UV) data overfitted while trained on PC showed a good generalization equivalent to an artificial neural network (ANN). Both LM and ANN showed moderate between-subject generalizations. \* $p < 0.05$  (paired t-test against LMUV).

### Patterns of brain-wide activity decode fear or safety and approach or avoidance across individuals

Although we found a poor between-subject generalization of decoder models if they were trained in specific individuals, we sought to investigate if our decoding pipeline could also identify patterns that decode stress coping-related states across subjects. Despite using a different algorithm, our ultimate results are equivalent in terms of spectral estimates and interpretation to that of Hultman et al. (2018), so we

will use the same nomenclature to address these patterns of electrical functional connectomes as electomes.

Remarkably, the most prominent characteristics of both the fear electome and the approach electome were brain-wide power and synchrony in the theta range (Fig. 10A-B). Particularly in the fear electome, it was observable a slight prominence within the beta (12-30 Hz) band (Fig. 10A). Taking the average of electome scores for all CS+ and CS- periods and pre-AP and pre-AV, the electomes identified correctly all stress-related states from all subjects (CS+ vs. CS-  $t(4) = 2.86$ ,  $p = 0.04$ ; AUC = 100%; Fig.



**Figure 10.** Patterns of brain-wide activity decode fear or safety and approach or avoidance across individuals. **A-B**, Electrical functional connectomes (electome) for decoding **(A)** fear vs. safety and **(B)** approach vs. avoidance. The models' coefficients (lines) reveal a distinct positive relevance for brain-wide synchrony in the theta frequencies. **C**, Average fear electome scores discriminate CS- and CS+ in all rats. **D**, Fear electome scores correlate with probabilities of avoidance during CS on test sessions. **E**, Average approach electome scores discriminate the periods preceding approach (AP) and avoidance (AV) in all rats. **F**, Increases in the approach electome scores predict both AP and AV crossings (grid lines) but are especially strong preceding AP. \* $p < 0.05$  (paired t-test).



10C; AP vs. AV  $t(4) = 4.33$ ,  $p = 0.01$ ; AUC = 100%; Fig. 10E). Similar to within-subject decoding, CS+/CS- decoder scores significantly correlated with later probabilities of avoidance on the test sessions ( $r(45) = 0.48$ ,  $p = 0.0005$ ; Fig. 10D), showing that the decoding dynamics were related to the learning dynamics. Hence, we hypothesized that AA decoder scores throughout the epochs could also reveal biologically-relevant information. For that, we trained the model considering 10 s before until 1 s after each crossing. We observed that the approach electome score gradually increased prior to the crossing, so the strength of this activity predicted the behavior (time x average score linear regression:  $r^2(9) = 0.81$ ,  $F(1,9) = 39.15$ ,  $p = 0.0001$ ; Fig. 10F). However, by looking at the pre-AV periods we saw a deeply lower electome score that gradually increased before AV crossings too (linear regression:  $r^2(9) = 0.90$ ,  $F(1,9) = 82.86$ ,  $p = 7.77 \times 10^{-6}$ ; Fig. 10F). Interestingly, the electome scores converged prior to both AP and AV crossings (RM two-way ANOVA time x valence interaction  $F(10,40) = 2.93$ ,  $p = 0.007$ ), suggesting that this activity may underlie both motivational valences.

In this regard, we realized that during the most distant pre-AV epochs, rats were usually on the reward. Thus, we may interpret the low approach electome scores, not particularly as fear but also as a reward consummatory state. The same interpretation can be used for the robust power increase in the NAc in these epochs, which is a pivotal region for reward processing. Again, the dynamics of decoder classification revealed behaviorally-relevant information, which was only allowed at post decoding inspection. Therefore, the lower engagement of this pattern of brain-wide theta activity could be related to a consummatory state, while the increases of this activity could be linked to a motivational drive underlying both approach or avoidance, but particularly stronger in positive valence.

## **Discussion**

### **An animal model to investigate fear, safety, approach, and avoidance**

Here we implemented an experimental design by merging the protocols of learned safety and platform-mediated avoidance in a way that allowed the within-subject distinction of states of fear, safety, approach, and avoidance. The learned safety protocol is based on the work of Rescorla (1969, 1971), showing that while a CS that predicts aversive shocks eventually elicits fear responses, a stimulus that is explicitly unpaired with shocks suppresses them (summation) and is more difficult to

associate later with fear (retardation). Our findings show that the CS- followed both criteria. It decreased the probabilities of avoidance, and CS+ took days to significantly increase them after reversal. Later studies in rodents showed that learned safety has antidepressant and stress mitigating properties, evokes distinct neural responses, and promotes approaches in anxiogenic environments, indicating these signals are not merely neutral (Pollak et al., 2008, 2010b). Our design differs from the original protocol in that we performed safety and fear conditioning in the same subjects instead of comparing two groups. It also differs from fear discrimination in that we conditioned an identical stimulus to both associations rather than two similar stimuli. In this regard, our work is the first investigation of oscillatory activity in this protocol of safety learning.

For the approach-avoidance task, we adapted the platform-mediated avoidance, designed by Quirk et al. (Bravo-Rivera et al., 2014; Diehl et al., 2019). Instead of using a Skinner box, we performed a low-cost open-source adaptation for reward delivery in a shuttle box. Although this protocol was originally designed to distinguish passive and active fear responses, we demonstrated that it could also reveal differential conditioning to fear and safety by increasing signaled avoidance and approach behaviors, respectively. In addition, this protocol clearly delineates positive (to reward) and aversive (to platform) valences of motivation to an identical behavioral response (crossing). We focused on active responses (avoidance and approach) rather than freezing to relate to the volitional aspect that defines stress coping (Lazarus and Folkman, 1984) and because interest in these processes has resurfaced in the last years (LeDoux et al., 2017).

### **Decoding behavioral/cognitive states by oscillatory activity**

Neural oscillations have been argued to provide a functional substrate while neuronal firing represents the actual code of information (Buzsáki et al., 2012). However, growing evidence shows that precise sensorimotor information can be decoded from electrical field potentials (Lebedev and Nicolelis, 2017; Anumanchipalli et al., 2019; Selfslagh et al., 2019; Frey et al., 2021). Here, we established a deterministic linear decoding pipeline based on standard methods of machine learning and showed that multi-site LFP activities could decode stress coping-related states. The decoding performances depended on behavioral (CS association, learning curve, prediction of events) and biological (preference to theta frequencies and specific

regions) variables. It exhibited significant generalization (across days in each rat) equivalently to ANNs, applicability for different investigations (fear vs. safety, and approach vs. avoidance), and allowed interpretation of the physiological relevance (a single coefficient to each variable). The pipeline used PCA, which has been successfully used for neural decoding based on the firing of neuronal ensembles (Chapin et al., 1999; Narayanan and Laubach, 2009; Cunningham and Yu, 2014; Dejean et al., 2016) but also on LFP (Markowitz et al., 2011), including a recent study investigating subnetworks associated with depression in humans (Scangos et al., 2021).

### **MLHFC theta network in stress coping**

We found that a MLHFC network synchronizes in the theta frequencies, and the strength of this activity discriminates conditioned fear and predicts active responses to stressors, especially, approach. While we confirm previous findings of limbic-cortical theta synchrony during fear (Seidenbecher et al., 2003; Lesting et al., 2011; Likhtik et al., 2014), we also evidence the participation of the mesolimbic system in this “theta network”. Although theta oscillations are originated in the hippocampus (Buzsáki, 2002), all regions comprising this network have been reported to exhibit local neuronal firing phase-locked to theta field (Sirota et al., 2008; Royer et al., 2010; Adhikari et al., 2011; Van Der Meer and Redish, 2011; Kim et al., 2012; Likhtik et al., 2014).

We have recently shown that theta synchrony during fear is linked to the expectancy of control over stressors (Marques et al., 2022). Although we have previously investigated only the intermediate HPC, we found that the DH and VH also synchronize with the PFC in anticipation of escapable shocks. Although the VH is usually more associated with innate averseness, evidence indicates the DH is particularly engaged during learned fear (Çalışkan and Stork, 2019), agreeing with our findings. Our results also support that changes in corticolimbic directionality discriminate safety from fear (Lesting et al., 2013; Likhtik et al., 2014). In fact, directionality showed robust performance for decoding fear vs. safety, particularly within theta frequencies.

The link between theta and avoidance came from a series of studies using the elevated plus maze in mice, where increases in VH-PFC synchrony were linked to avoidance of the open arms (Adhikari et al., 2010; Padilla-Coreano et al., 2019). This

task relies on rodents' innate aversion to open areas, while the 'approach' motivation only occurs due to inherent exploratory drive. By making the reward component more explicit, we found that stronger theta activity predicted approach. Because theta activity is correlated with movement (McFarland et al., 1975), we still do not discard the possibility that our findings on theta activity may be related to translocation, particularly during the conditioning sessions. This issue will be addressed before the formal submission of this article. However, in the AA task, we analyzed epochs that mostly considered preparatory states before crossings. Overall, these findings also fit a general proposition that theta correlates with preparatory rather than consummatory behaviors (Buzsáki, 2002).

In conclusion, our work suggests that theta activity underlies active stress coping, and this processing occurs at the brain-wide network level. The preferential engagement of network theta activity during controllable stress and positive motivational valence highlights the potential of theta modulating therapies for stress-related disorders characterized by cognitive and motivational deficits, such as depression. However, it suggests caution for those related to threat detection, such as anxiety and trauma.

### **Brain-wide network processing**

Large-scale brain networks have been implicated in cognition, emotion, and psychopathologies (Bressler and Menon, 2010; Menon, 2011; Bassett and Sporns, 2017). Identifying dysfunctional networks is a key goal to develop personalized treatments for anxiety and depression (Williams, 2016). Evidence that stress is associated with brain-wide activity comes from studies of resting-state neuroimaging (Magalhães et al., 2018, 2019), immediate-gene expression (Wheeler et al., 2013; Besnard et al., 2019; Worley et al., 2020), and, only recently, neural oscillations (Hultman et al., 2018; Scangos et al., 2021).

This is the first study of our knowledge to test the relationship between neural oscillations, the number of regions spread across a brain-wide network, and the encoding of stress-related information. We found a positive relationship between decoding performance of stress coping states and the number of regions included, which reached the best performance if all regions were considered. All regions performed better than each separately, even when considered as hubs. This

relationship happened in a logarithmic function, which indicates that few regions already carry relevant information, but decoding still keeps improving with more regions. A similar pattern was found between decoding motor actions and the number of electrodes in the primate motor cortex, suggesting a generalized property of oscillatory coding (Markowitz et al., 2011). In addition, we also observed that all estimates – power, coherence, and directionality – presented greater performance together. Importantly, these findings can not be explained by biases from a variable number of attributes because we fixed these numbers across comparisons. Thus, we suggest that the better performance of a brain-wide activity is evidence that stress coping-related information is encoded at a large-scale network level.

### **Individual variability in brain synchrony and stress processing**

Many reports show individual variability in oscillatory activity linked to stress processing (Likhtik et al., 2014; Hultman et al., 2018; Thériault et al., 2021; Marques et al., 2022). Here we found a significant generalization of decoder models tested within each rat but not between individuals, evidencing remarkable variability in stress processing. However, we observed that individual variability of oscillatory activity is greater for invariant brain activity between individuals than between stress states.

Synchrony was the measure with the most significant individual variability. We noticed whole-spectrum differences in coherence across pairs of regions. For example, most rats exhibited a markedly greater whole-spectrum coherence between the VTA and the NAc, while others did not. Adhikari et al. (2010) reported greater whole-spectrum coherence between the PFC and the VH than with the DH, suggesting this may be related to anatomical connectivity. If these variabilities result from the accumulated differences in the implant coordinates or if they emerge from brain differences remains elusive. Nonetheless, there is accumulating evidence that patterns of functional connectivity (Mueller et al., 2013; Finn et al., 2015) and electroencephalographic synchrony (Kondacs and Szabó, 1999; Kong et al., 2019) can distinguish individuals, supporting a physiological basis. Also interestingly, despite the observed diversity of synchrony patterns, we noticed they all resembled a small-world topology, in agreement with previous studies on brain connectivity (Bassett and Bullmore, 2006; Bullmore and Sporns, 2012).

## Electomes

Machine learning is a powerful tool for identifying complex patterns in biological data, which often presents the drawbacks of difficult interpretation, reproducibility, and integration. Therefore, contemplating these aspects is required to ensure the trustworthiness of this approach (Vu et al., 2018; Heil et al., 2021). The electomes of fear and approach identified here are remarkably similar to the *electome factor 1* reported in Hultman et al. (2018). Both patterns are represented by increases in brain-wide theta synchrony and smaller increases in the beta ranges. Although power and directionality are distinct, the coherence similarity between patterns is close to qualifying this finding as a replication. Intriguingly, Drysdale et al. (2017) distinguished two patterns of functional connectivity that correlated to measures of either anxiety or anhedonia, defining biotypes of clinical depression that are differentially responsive to treatments. Taken together, our findings indicate an important neurobiological distinction between the dimensions of motivation (valence/anhedonia) and threat detection (fear vs. safety/anxiety) that could guide neurophysiologically-informed treatment decisions for mood and anxiety disorders.

## Conclusions

Our work evidence that stress coping is processed at the brain-wide level with remarkable individual variability. Our findings also add to a recent proposition that theta oscillations underlie active stress coping, showing that it occurs at a large-scale network and is associated with both aversive and, especially, positive motivational valence. This study highlights the potential of multi-site electrophysiology combined with artificial intelligence to discover complex patterns of network function associated with stress-related disorders.

## References

- Adhikari A, Topiwala MA, Gordon JA (2010) Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. *Neuron* 65:257–269.
- Adhikari A, Topiwala MA, Gordon JA (2011) Single units in the medial prefrontal cortex with anxiety-related firing patterns are preferentially influenced by ventral hippocampal activity. *Neuron* 71:898–910.

- Anumanchipalli GK, Chartier J, Chang EF (2019) Speech synthesis from neural decoding of spoken sentences. *Nature* 568:493–498.
- Bassett DS, Bullmore E (2006) Small-world brain networks. *Neuroscientist* 12:512–523.
- Bassett DS, Sporns O (2017) Network neuroscience. *Nat Neurosci* 20:353–364.
- Besnard A, Gao Y, TaeWoo Kim M, Twarkowski H, Reed AK, Langberg T, Feng W, Xu X, Saur D, Zweifel LS, Davison I, Sahay A (2019) Dorsolateral septum somatostatin interneurons gate mobility to calibrate context-specific behavioral fear responses. *Nat Neurosci* 22:436–446.
- Bravo-Rivera C, Roman-Ortiz C, Brignoni-Perez E, Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2014) Neural structures mediating expression and extinction of platform-mediated avoidance. *J Neurosci* 34:9736–9742.
- Bressler SL, Menon V (2010) Large-scale brain networks in cognition: emerging methods and principles. *Trends Cogn Sci* 14:277–290.
- Bueno-Junior LS, Peixoto-Santos JE, Ruggiero RN, Ávila MAV, Marques DB, Lopes-Aguiar C, Leite JP (2018) Interaction between hippocampal-prefrontal plasticity and thalamic-prefrontal activity. *Sci Rep* 8:1–13.
- Bullmore E, Sporns O (2012) The economy of brain network organization. *Nat Rev Neurosci* 13:336–349.
- Buzsáki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33:1–20.
- Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C (2012) The origin of extracellular fields and currents-EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci* 13:407–420.
- Çalışkan G, Stork O (2019) Hippocampal network oscillations at the interplay between innate anxiety and learned fear. *Psychopharmacology (Berl)* 236:321–338.
- Chapin JK, Moxon KA, Markowitz RS, Nicolelis MAL (1999) Real-time control of a robot arm using simultaneously recorded neurons in the motor cortex. *Nat Neurosci* 2:664–670.
- Cunningham JP, Yu BM (2014) Dimensionality reduction for large-scale neural recordings. *Nat Neurosci* 17:1500–1509.
- Dejean C, Courtin J, Karalis N, Chaudun F, Wurtz H, Bienvenu TCM, Herry C (2016) Prefrontal neuronal assemblies temporally control fear behaviour. *Nature* 535:420–424.

- Diehl MM, Bravo-Rivera C, Quirk GJ (2019) The study of active avoidance: A platform for discussion. *Neurosci Biobehav Rev* 107:229–237.
- Drysdale AT et al. (2017) Resting-state connectivity biomarkers define neurophysiological subtypes of depression. *Nat Med* 23:28–38.
- Dunlop BW, Rajendra JK, Craighead WE, Kelley ME, McGrath CL, Choi KS, Kinkead B, Nemeroff CB, Mayberg HS (2017) Functional connectivity of the subcallosal cingulate cortex and differential outcomes to treatment with cognitive-behavioral therapy or antidepressant medication for major depressive disorder. *Am J Psychiatry* 174:533–545.
- Feder A, Fred-Torres S, Southwick SM, Charney DS (2019) The Biology of Human Resilience: Opportunities for Enhancing Resilience Across the Life Span. *Biol Psychiatry* 86:443–453.
- Finn ES, Shen X, Scheinost D, Rosenberg MD, Huang J, Chun MM, Papademetris X, Constable RT (2015) Functional connectome fingerprinting: Identifying individuals using patterns of brain connectivity. *Nat Neurosci* 18:1664–1671.
- Frey M, Tanni S, Perrodin C, O’leary A, Nau M, Kelly J, Banino A, Bendor D, Lefort J, Doeller CF, Barry C (2021) Interpreting wide-band neural activity using convolutional neural networks. *Elife* 10.
- Fries P (2015) Rhythms for Cognition: Communication through Coherence. *Neuron* 88:220–235.
- Gazendam FJ, Kamphuis JH, Kindt M (2013) Deficient safety learning characterizes high trait anxious individuals. *Biol Psychol* 92:342–352.
- Godoy LD, Rossignoli MT, Delfino-Pereira P, Garcia-Cairasco N, Umeoka EH de L (2018) A comprehensive overview on stress neurobiology: Basic concepts and clinical implications. *Front Behav Neurosci* 12:1–23.
- Grossman Y, Dzirasa K (2020) Is depression a disorder of electrical brain networks? *Neuropsychopharmacology* 45:230–231.
- Harris AZ, Gordon JA (2015) Long-range neural synchrony in behavior. *Annu Rev Neurosci* 38:171–194.
- Heil BJ, Hoffman MM, Markowitz F, Lee SI, Greene CS, Hicks SC (2021) Reproducibility standards for machine learning in the life sciences. *Nat Methods* 18:1132–1135.
- Hultman R, Ulrich K, Sachs BD, Blount C, Carlson DE, Ndubuizu N, Bagot RC,



- Parise EM, Vu MAT, Gallagher NM, Wang J, Silva AJ, Deisseroth K, Mague SD, Caron MG, Nestler EJ, Carin L, Dzirasa K (2018) Brain-wide electrical spatiotemporal dynamics encode depression vulnerability. *Cell* 173:166-180.e14.
- Jacinto LR, Cerqueira JJ, Sousa N (2016) Patterns of theta activity in limbic anxiety circuit preceding exploratory behavior in approach-avoidance conflict. *Front Behav Neurosci* 10.
- Jovanovic T, Kazama A, Bachevalier J, Davis M (2012) Impaired safety signal learning may be a biomarker of PTSD. *Neuropharmacology* 62:695–704.
- Kim Y, Wood J, Moghaddam B (2012) Coordinated activity of ventral tegmental neurons adapts to appetitive and aversive learning. *PLoS One* 7:e29766.
- Kondacs A, Szabó M (1999) Long-term intra-individual variability of the background EEG in normals. *Clin Neurophysiol* 110:1708–1716.
- Kong E, Monje FJ, Hirsch J, Pollak DD (2014) Learning not to fear: Neural correlates of learned safety. *Neuropsychopharmacology* 39:515–527.
- Kong W, Wang L, Xu S, Babiloni F, Chen H (2019) EEG Fingerprints: Phase Synchronization of EEG Signals as Biomarker for Subject Identification. *IEEE Access* 7:121165–121173.
- Korotkova T, Ponomarenko A, Monaghan CK, Poulter SL, Cacucci F, Wills T, Hasselmo ME, Lever C (2018) Reconciling the different faces of hippocampal theta: The role of theta oscillations in cognitive, emotional and innate behaviors. *Neurosci Biobehav Rev* 85:65–80.
- Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J, Varela FJ (1999) Measuring phase synchrony in brain signals. *Hum Brain Mapp* 8:194–208.
- Lazarus RS, Folkman S (1984) *Stress, Appraisal, and Coping*. New York: Springer.
- Lebedev MA, Nicolelis MAL (2017) Brain-machine interfaces: From basic science to neuroprostheses and neurorehabilitation. *Physiol Rev* 97:767–837.
- LeDoux JE, Moscarello J, Sears R, Campese V (2017) The birth, death and resurrection of avoidance: A reconceptualization of a troubled paradigm. *Mol Psychiatry* 22:24–36.
- Lesting J, Daldrup T, Narayanan V, Himpe C, Seidenbecher T, Pape HC (2013) Directional theta coherence in prefrontal cortical to amygdalo-hippocampal pathways signals fear extinction. *PLoS One* 8:17–19.
- Lesting J, Narayanan RT, Kluge C, Sangha S, Seidenbecher T, Pape HC (2011)

- Patterns of coupled theta activity in amygdala-hippocampal-prefrontal cortical circuits during fear extinction. *PLoS One* 6:e21714.
- Likhtik E, Stujenske JM, Topiwala MA, Harris AZ, Gordon JA (2014) Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. *Nat Neurosci* 17:106–113.
- Magalhães R, Barrière DA, Novais A, Marques F, Marques P, Cerqueira J, Sousa JC, Cachia A, Boumezbeur F, Bottlaender M, Jay TM, Mériaux S, Sousa N (2018) The dynamics of stress: a longitudinal MRI study of rat brain structure and connectome. *Mol Psychiatry* 23:1998–2006.
- Magalhães R, Novais A, Barrière DA, Marques P, Marques F, Sousa JC, Cerqueira JJ, Cachia A, Jay TM, Bottlaender M, Sousa N, Mériaux S, Boumezbeur F (2019) A resting-state functional MR imaging and spectroscopy study of the dorsal hippocampus in the chronic unpredictable stress rat model. *J Neurosci* 39:3640–3650.
- Maier SF, Amat J, Baratta M V., Paul E, Watkins LR (2006) Behavioral control, the medial prefrontal cortex, and resilience. *Dialogues Clin Neurosci* 8:397–406.
- Markowitz DA, Wong YT, Gray CM, Pesaran B (2011) Optimizing the decoding of movement goals from local field potentials in macaque cortex. *J Neurosci* 31:18412–18422.
- Marques DB, Ruggiero RN, Bueno-Junior LS, Rossignoli MT, Leite JP (2022) Prediction of Learned Resistance or Helplessness by Hippocampal-Prefrontal Cortical Network Activity during Stress. *J Neurosci* 42:81–96.
- McFarland WL, Teitelbaum H, Hedges EK (1975) Relationship between hippocampal theta activity and running speed in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 88:324–328.
- Menon V (2011) Large-scale brain networks and psychopathology: A unifying triple network model. *Trends Cogn Sci* 15:483–506.
- Mitra P, Bokil H (2009) *Observed Brain Dynamics*. Oxford: Oxford University Press.
- Mueller S, Wang D, Fox MD, Yeo BTT, Sepulcre J, Sabuncu MR, Shafee R, Lu J, Liu H (2013) Individual Variability in Functional Connectivity Architecture of the Human Brain. *Neuron* 77:586–595.
- Narayanan NS, Laubach M (2009) Methods for studying functional interactions among neuronal populations. *Methods Mol Biol* 489:135–165.
- Padilla-Coreano N, Canetta S, Mikofsky RM, Alway E, Passecker J, Myroshnychenko

- M V., Garcia-Garcia AL, Warren R, Teboul E, Blackman DR, Morton MP, Hupalo S, Tye KM, Kellendonk C, Kupferschmidt DA, Gordon JA (2019) Hippocampal-Prefrontal Theta Transmission Regulates Avoidance Behavior. *Neuron* 104:601-610.e4.
- Paxinos G, Watson C (2009) *The rat brain in stereotaxic coordinates: compact sixth edition*. Oxford: Academic.
- Pollak DD, Monje FJ, Lubec G (2010a) The learned safety paradigm as a mouse model for neuropsychiatric research. *Nat Protoc* 5:954–962.
- Pollak DD, Monje FJ, Zuckerman L, Denny CA, Drew MR, Kandel ER (2008) An Animal Model of a Behavioral Intervention for Depression. *Neuron* 60:149–161.
- Pollak DD, Rogan MT, Egner T, Perez DL, Yanagihara TK, Hirsch J (2010b) A translational bridge between mouse and human models of learned safety. *Ann Med* 42:115–122.
- Rescorla RA (1969) Conditioned inhibition of fear resulting from negative CS-US contingencies. *J Comp Physiol Psychol* 67:504–509.
- Rescorla RA (1971) Summation and retardation tests of latent inhibition. *J Comp Physiol Psychol* 75:77–81.
- Royer S, Sirota A, Patel J, Buzsaki G (2010) Distinct representations and theta dynamics in dorsal and ventral hippocampus. *J Neurosci* 30:1777–1787.
- Scangos KW, Khambhati AN, Daly PM, Owen LW, Manning JR, Ambrose JB, Austin E, Dawes HE, Krystal AD, Chang EF (2021) Distributed Subnetworks of Depression Defined by Direct Intracranial Neurophysiology. *Front Hum Neurosci* 15.
- Seidenbecher T, Laxmi TR, Stork O, Pape HC (2003) Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science* 301:846–850.
- Selfslagh A, Shokur S, Campos DSF, Donati ARC, Almeida S, Yamauti SY, Coelho DB, Bouri M, Nicoletis MAL (2019) Non-invasive, Brain-controlled Functional Electrical Stimulation for Locomotion Rehabilitation in Individuals with Paraplegia. *Sci Rep* 9:6782.
- Sirota A, Montgomery S, Fujisawa S, Isomura Y, Zugaro M, Buzsáki G (2008) Entrainment of Neocortical Neurons and Gamma Oscillations by the Hippocampal Theta Rhythm. *Neuron* 60:683–697.

- Sousa N (2016) The dynamics of the stress neuromatrix. *Mol Psychiatry* 21:302–312.
- Southwick SM, Pietrzak RH, Charney DS, Krystal JH (2015) Resilience: The role of accurate appraisal, thresholds, and socioenvironmental factors. *Behav Brain Sci* 38:e122.
- Taub AH, Perets R, Kahana E, Paz R (2018) Oscillations Synchronize Amygdala-to-Prefrontal Primate Circuits during Aversive Learning. *Neuron* 97:291-298.e3.
- Thériault RK, Manduca JD, Perreault ML (2021) Sex differences in innate and adaptive neural oscillatory patterns link resilience and susceptibility to chronic stress in rats. *J Psychiatry Neurosci* 46:E258–E270.
- Trew JL (2011) Exploring the roles of approach and avoidance in depression: An integrative model. *Clin Psychol Rev* 31:1156–1168.
- Van Der Meer MAA, Redish AD (2011) Theta phase precession in rat ventral striatum links place and reward information. *J Neurosci* 31:2843–2854.
- Vu M-AT, Adalı T, Ba D, Buzsáki G, Carlson D, Heller K, Liston C, Rudin C, Sohal VS, Widge AS, Mayberg HS, Sapiro G, Dzirasa K (2018) A Shared Vision for Machine Learning in Neuroscience. *J Neurosci* 38:1601–1607.
- Wheeler AL, Teixeira CM, Wang AH, Xiong X, Kovacevic N, Lerch JP, McIntosh AR, Parkinson J, Frankland PW (2013) Identification of a Functional Connectome for Long-Term Fear Memory in Mice. *PLoS Comput Biol* 9:e1002853.
- Williams LM (2016) Precision psychiatry: A neural circuit taxonomy for depression and anxiety. *The Lancet Psychiatry* 3:472–480.
- Worley NB, Everett SR, Foilb AR, Christianson JP (2020) Functional networks activated by controllable and uncontrollable stress in male and female rats. *Neurobiol Stress* 13:100233.

#### 4. CONCLUSÕES

A partir dos estudos apresentados aqui, concluímos que:

a) Variabilidade individual, comportamental e neural:

- A delimitação experimental de fatores relacionados à avaliação cognitiva durante situações de estresse como variáveis independentes é relevante para emergência de fenótipos comportamentais e padrões de atividade neural, como demonstrado aqui para controlabilidade, segurança e valência.
- Há significativa variabilidade individual, de origem inata e adquirida, nos padrões multivariados de comportamento e atividade oscilatória durante enfrentamento ao estresse. Observamos que decodificadores neurais treinados em um rato classificam bem quando testados em novos dados do mesmo indivíduo mas falham em classificar estados de outros ratos. No entanto, atividades nas frequências teta apresentam generalização interindividual como marcadores de estados ou estilos de enfrentamento.
- Também há relevante variabilidade neurofisiológica independente de estresse e comportamento, que é capaz de distinguir indivíduos com alta precisão, sugerindo a existência de impressões digitais de conectividade neurofuncional.

b) Oscilações teta e enfrentamento ao estresse:

- Padrões de atividade oscilatória relacionados ao aumento da potência, sincronia, acoplamento de atividade local e mudanças na direcionalidade das oscilações teta são correlatos a estresse controlável com ambas valências aversiva e, especialmente, positiva (Fig. 13).
- Comportamentos inatos classicamente indicativos de resiliência, a saber, nado forçado, preferência por sacarose e interação social apresentam natureza rítmica na mesma frequência das oscilações teta, o que sugere possível relação funcional de integração sensório-motora.
- Nossos estudos sugerem que as variadas funções – cognitivas, emocionais, motivacionais e sensório-motoras – atribuídas às oscilações teta fazem parte de um *continuum* multidimensional associado ao enfrentamento ativo ao estresse.

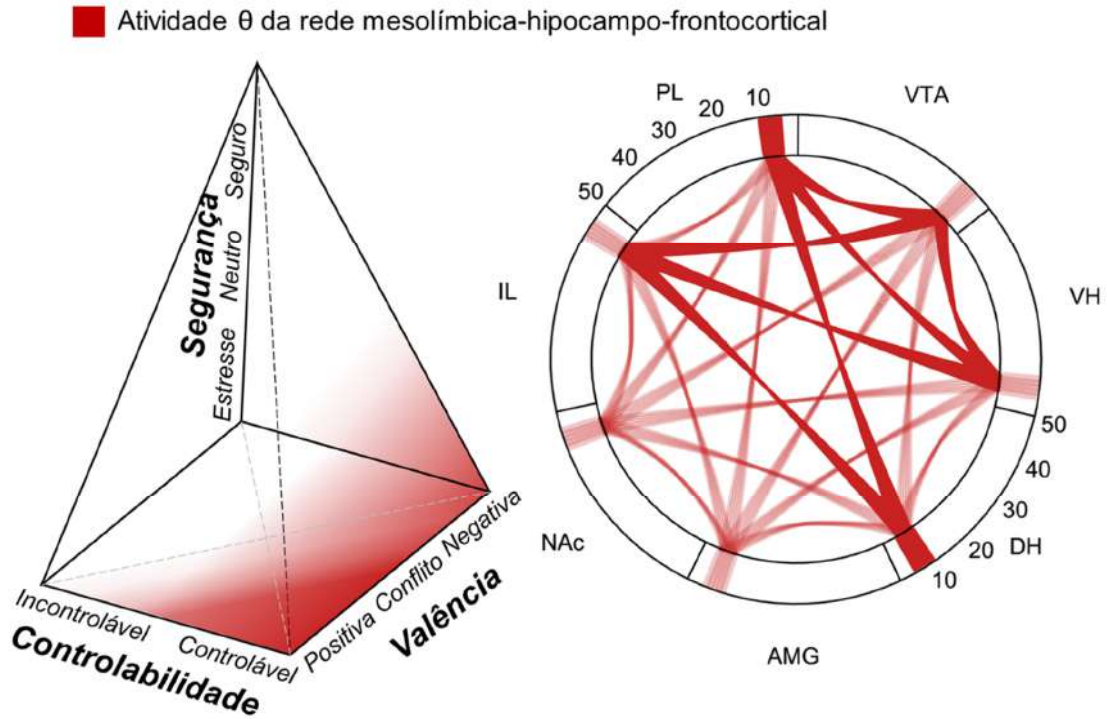
c) Significados gerais:

- Oscilações neurais são componentes fundamentais da biologia do enfrentamento ao estresse. Estados e perfis comportamentais que manifestam diferentes dimensões de enfrentamento ao estresse podem ser decodificados ou preditos pela atividade oscilatória.
- O processamento de estratégias de enfrentamento ao estresse envolve atividade oscilatória em rede de encéfalo todo, abrangendo, pelo menos, do córtex pré-frontal ao mesencéfalo. Observamos uma relação positiva entre a performance de decodificação neural e o número de regiões analisadas, e verificamos que esta relação ocorre em função logarítmica, o que significa que poucas regiões já apresentam boa performance mas mais regiões continuam contribuindo na classificação, sugerindo a relevância tanto do processamento local quanto global destas informações.
- Padrões de atividade oscilatória durante estratégias adaptativas de enfrentamento ao estresse apresentam maior complexidade e distinção, o que enfatiza a relevância da descrição de marcadores biológicos associados à resiliência e apoia a noção de que a vulnerabilidade ao estresse pode ocorrer pela ausência ou disfunção destes processos adaptativos.

#### d) Implicações translacionais

- A associação positiva entre o aumento da atividade em teta frontal e resistência ao estresse apoia o potencial translacional terapêutico desta atividade como biomarcador de resposta a tratamentos e como guia para otimização de terapias de estimulação cerebral rítmica para transtornos psiquiátricos relacionados ao estresse.
- Nossos achados apontam que a detecção de *segurança* tem mecanismos neurais distintos da expectativa de *controle* e de *recompensa* durante estresse. Esta interpretação implica que tratamentos que favorecem um dos mecanismos pode não facilitar, ou mesmo prejudicar, o outro.
- A combinação entre análises de sinal de atividade eletrofisiológica oscilatória e ferramentas de aprendizado de máquina é promissora para investigação biológica do estresse. O desenvolvimento desta abordagem pode contribuir para aplicação em psiquiatria de precisão informando

decisões terapêuticas de modo a considerar a complexidade das variabilidades individual, comportamental e neurofisiológica.



**Figura 13** – Localização da atividade em teta da rede MLHFC nas dimensões psicobiológicas de enfrentamento ao estresse revela uma preferência do engajamento durante estresse controlável de ambas valências negativa e, especialmente, positiva.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABBAFATI, C. et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 396, n. 10258, p. 1024–1222, 2020.
- ABRAMSON, L. Y.; SELIGMAN, M. E.; TEASDALE, J. D. Learned helplessness in humans: Critique and reformulation. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 87, n. 1, p. 49–74, 1978.
- ADEY, W. R.; DUNLOP, C. W.; HENDRIX, C. E. Hippocampal Slow Waves: Distribution and Phase Relationships in the Course of Approach Learning. **Archives of Neurology**, v. 3, n. 1, p. 74–90, 1 jul. 1960.
- ADHIKARI, A.; TOPIWALA, M. A.; GORDON, J. A. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. **Neuron**, v. 65, n. 2, p. 257–269, 2010.
- ADHIKARI, A.; TOPIWALA, M. A.; GORDON, J. A. Single units in the medial prefrontal cortex with anxiety-related firing patterns are preferentially influenced by ventral hippocampal activity. **Neuron**, v. 71, n. 5, p. 898–910, 2011.
- AKRAM, U. et al. Exploratory study on the role of emotion regulation in perceived valence, humour, and beneficial use of depressive internet memes in depression. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais: DSM-5**. 5a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- ANTONOVSKY, A. **Health, Stress and Coping**. Ann Arbor: Jossey-Bass Inc Pub, 1979.
- APA. **Building your resilience**. Disponível em: <<https://www.apa.org/topics/resilience>>. Acesso em: 13 jan. 2022.
- BAGOT, R. C. et al. Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 8 maio 2015.
- BARKUS, C. et al. Variation in serotonin transporter expression modulates fear-evoked hemodynamic responses and theta-frequency neuronal oscillations in the amygdala. **Biological Psychiatry**, v. 75, n. 11, p. 901–908, 2014.
- BARTHOLOMEW, D. J. Spearman and the origin and development of factor analysis. **British Journal of Mathematical and Statistical Psychology**, v. 48, n. 2, p. 211–220, 1 nov. 1995.
- BECK, A. T.; ALFORD, B. A. **Depression: Causes and Treatment**. 2nd. ed. Filadélfia: University of Pennsylvania Press, 2009.
- BEJJANI, B.-P. et al. Transient Acute Depression Induced by High-Frequency Deep-Brain Stimulation. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 19, p. 1476–1480, 13 maio 1999.
- BERRIDGE, K. C. From prediction error to incentive salience: mesolimbic computation of reward motivation. **The European journal of neuroscience**, v. 35, n. 7, p. 1124–1143, abr. 2012.
- BERRIDGE, K. C. Evolving Concepts of Emotion and Motivation. **Frontiers in Psychology**, v. 9, n. SEP, 7 set. 2018.
- BHATNAGAR, S. Rethinking stress resilience. **Trends in Neurosciences**, v. 44, n. 12, p. 936–945, 1 dez. 2021.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. An ethoexperimental analysis of defense, fear and anxiety. In: MCNAUGHTON, N.; ANDREWS, G. (Eds.). **Anxiety**. Dunedin: Otago University Press, 1990. p. 124–133.



- BLAND, B. H.; ODDIE, S. D. Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. **Behavioural brain research**, v. 127, n. 1–2, p. 119–136, 14 dez. 2001.
- BRADLEY, M. M. et al. Remembering pictures: Pleasure and arousal in memory. **Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition**, v. 18, n. 2, p. 379, 1992.
- BRAVO-RIVERA, C. et al. Neural structures mediating expression and extinction of platform-mediated avoidance. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 29, p. 9736–42, 2014.
- BRESSLER, S. L.; MENON, V. Large-scale brain networks in cognition: emerging methods and principles. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 14, n. 6, p. 277–90, 2010.
- BRIAN H, B. The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. **Progress in Neurobiology**, v. 26, n. 1, p. 1–54, 1986.
- BROMBERG-MARTIN, E. S.; MATSUMOTO, M.; HIKOSAKA, O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. **Neuron**, v. 68, n. 5, p. 815–834, 9 dez. 2010.
- BURGOS-ROBLES, A.; VIDAL-GONZALEZ, I.; QUIRK, G. J. Sustained conditioned responses in prelimbic prefrontal neurons are correlated with fear expression and extinction failure. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 26, p. 8474–8482, 2009.
- BURTON, R. **The Anatomy of Melancholy, What it is, With all the Kinds, Causes, Symptomes, Prognostickes, and Several Cures of it. In Three Maine Partitions with their several Sections, Members, and Subsections. Philosophically, Medicinally, Historically, Opened and C.** 1st. ed. Oxford: John Lichfield, for Henry Cripps, 1621.
- BUZSÁKI, G. Theta oscillations in the hippocampus. **Neuron**, v. 33, n. 3, p. 1–20, 2002.
- BUZSÁKI, G. Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. **Hippocampus**, v. 15, n. 7, p. 827–840, 2005.
- BUZSÁKI, G. **Rhythms of the Brain**. 1st. ed. New York: Oxford University Press, 2006.
- BUZSÁKI, G. The Brain–Cognitive Behavior Problem: A Retrospective. **eNeuro**, v. 7, n. 4, p. 1–8, 1 jul. 2020.
- BUZSÁKI, G. **The brain from inside out**. New York: Oxford University Press, USA, 2021.
- BUZSÁKI, G.; ANASTASSIOU, C. A.; KOCH, C. The origin of extracellular fields and currents-EEG, ECoG, LFP and spikes. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 407–420, 2012.
- BUZSÁKI, G.; DRAGUHN, A. Neuronal oscillations in cortical networks. **Science**, v. 304, n. 5679, p. 1926–1929, 2004.
- BUZSÁKI, G.; LOGOTHETIS, N. K. .; SINGER, W. Scaling Brain Size, Keeping Timing: Evolutionary Preservation of Brain Rhythms. **Neuron**, v. 80, n. 3, p. 751–764, 2013.
- BUZSÁKI, G.; TINGLEY, D. Space and Time: The Hippocampus as a Sequence Generator. **Trends in cognitive sciences**, v. 22, n. 10, p. 853–869, 1 out. 2018.
- ÇALIŞKAN, G.; STORK, O. Hippocampal network oscillations at the interplay between innate anxiety and learned fear. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 1, p. 321–338, 2019.

- CAMPESE, V. D. et al. The Neural Foundations of Reaction and Action in Aversive Motivation. **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 27, p. 171–195, 1 jun. 2016.
- CANTERAS, N. S.; GRAEFF, F. G. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: Implications for panic disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46, n. P3, p. 352–364, 2014.
- CAREAGA, M. B. L.; GIRARDI, C. E. N.; SUCHECKI, D. Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 71, p. 48–57, 1 dez. 2016.
- CASPI, A. et al. Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. **Science**, v. 301, n. 5631, p. 386–389, 18 jul. 2003.
- CASTRÉN, E. Is mood chemistry? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 241–246, 2005.
- CAVANAGH, J. F. et al. Electrophysiological biomarkers of behavioral dimensions from cross-species paradigms. **Translational Psychiatry**, v. 11, n. 1, 2021.
- CAVANAGH, J. F.; FRANK, M. J. Frontal theta as a mechanism for cognitive control. **Trends in cognitive sciences**, v. 18, n. 8, p. 414–21, 2014.
- CHAUDHURY, D. et al. Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. **Nature**, v. 493, n. 7433, p. 532–536, 12 dez. 2012.
- CHRISTIANSON, J. P. et al. Safety signals mitigate the consequences of uncontrollable stress via a circuit involving the sensory insular cortex and bed nucleus of the stria terminalis. **Biological psychiatry**, v. 70, n. 5, p. 458–464, 1 set. 2011.
- CHRISTIANSON, J. P. et al. Inhibition of fear by learned safety signals: A mini-symposium review. **Journal of Neuroscience**, 2012.
- CHUNG, S. W.; HOY, K. E.; FITZGERALD, P. B. Theta-burst stimulation: a new form of tms treatment for depression? **Depression and Anxiety**, v. 32, n. 3, p. 182–192, 2015.
- COLE, E. J. et al. Stanford accelerated intelligent neuromodulation therapy for treatment-resistant depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 177, n. 8, p. 716–726, 2020.
- COLE, E. J. et al. Stanford Neuromodulation Therapy (SNT): A Double-Blind Randomized Controlled Trial. **American Journal of Psychiatry**, 29 out. 2021.
- COLGIN, L. L. Mechanisms and functions of theta rhythms. **Annual review of neuroscience**, v. 36, p. 295–312, jul. 2013.
- COLGIN, L. L. Rhythms of the hippocampal network. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 17, n. 4, p. 239–249, 1 abr. 2016.
- COPPEN, A. The biochemistry of affective disorders. **The British Journal of Psychiatry**, v. 113, n. 504, p. 1237–1264, 1967.
- COURTIN, J. et al. Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. **Nature**, v. 505, n. 7481, p. 92–96, 2014.
- COVINGTON, H. E. et al. Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. **The Journal of neuroscience**, v. 30, n. 48, p. 16082–16090, 1 dez. 2010.
- CUTHBERT, B. N.; INSEL, T. R. Toward the future of psychiatric diagnosis: The seven pillars of RDoC. **BMC Medicine**, 2013.
- DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 46–56, jan. 2008.

- DAVIDSON, R. J. et al. Depression: perspectives from affective neuroscience. **Annual review of psychology**, v. 53, p. 545–574, 2002.
- DAVIDSON, R. J.; LUTZ, A. Buddha's Brain: Neuroplasticity and Meditation. **IEEE signal processing magazine**, v. 25, n. 1, p. 172–176, 2008.
- DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–475, 13 maio 2005.
- DEL ARCO, A.; PARK, J.; MOGHADDAM, B. Unanticipated Stressful and Rewarding Experiences Engage the Same Prefrontal Cortex and Ventral Tegmental Area Neuronal Populations. **eNeuro**, v. 7, n. 3, p. 1–13, 1 maio 2020.
- DIEHL, M. M.; BRAVO-RIVERA, C.; QUIRK, G. J. The study of active avoidance: A platform for discussion. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 107, p. 229–237, 2019.
- DINGA, R. et al. Evaluating the evidence for biotypes of depression: Methodological replication and extension of. **NeuroImage: Clinical**, v. 22, p. 101796, 1 jan. 2019.
- DRYSDALE, A. T. et al. Resting-state connectivity biomarkers define neurophysiological subtypes of depression. **Nature Medicine**, v. 23, n. 1, p. 28–38, 2017.
- DUMAN, R. S.; HENINGER, G. R.; NESTLER, E. J. A Molecular and Cellular Theory of Depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 54, n. 7, p. 597–606, 1 jul. 1997.
- DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116–1127, 15 jun. 2006.
- EICHENBAUM, H. On the Integration of Space, Time, and Memory. **Neuron**, v. 95, n. 5, p. 1007–1018, 30 ago. 2017.
- FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, 2010.
- FEDER, A. et al. The Biology of Human Resilience: Opportunities for Enhancing Resilience Across the Life Span. **Biological Psychiatry**, v. 86, n. 6, p. 443–453, 2019.
- FOILB, A. R. et al. Neural correlates of safety learning. **Behavioural Brain Research**, v. 396, 2021.
- FOLKMAN, S. et al. Dynamics of a Stressful Encounter. Cognitive Appraisal, Coping, and Encounter Outcomes. **Journal of Personality and Social Psychology**, 1986.
- FOLKMAN, S. Positive psychological states and coping with severe stress. **Social Science & Medicine**, v. 45, n. 8, p. 1207–1221, out. 1997.
- FOLKMAN, S. The case for positive emotions in the stress process. **Anxiety, stress, and coping**, v. 21, n. 1, p. 3–14, jan. 2008.
- FOLKMAN, S.; LAZARUS, R. S. An analysis of coping in a middle-aged community sample. **Journal of Health and Social Behavior**, v. 21, n. 3, p. 219–239, 1980.
- FRANKL, V. E.; SHLUPP, W. O.; AVELINE, C. C. **TRAD. Em busca de sentido: um psicólogo no campo de concentração**. 4a. ed. Petrópolis: Editora Vozes, 2021.
- FRIES, P. A mechanism for cognitive dynamics: Neuronal communication through neuronal coherence. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 9, n. 10, p. 474–480, 2005.
- FRIES, P. Rhythms for Cognition: Communication through Coherence. **Neuron**, v. 88, n. 1, p. 220–35, 2015.
- GARMEZY, N.; STREITMAN, S. Children at Risk: The Search for the Antecedents of Schizophrenia. Part I. Conceptual Models and Research Methods. **Schizophrenia Bulletin**, v. 1, n. 8, p. 14–90, 1 jan. 1974.

- GENUD-GABAI, R.; KLAVIR, O.; PAZ, R. Safety signals in the primate amygdala. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 46, p. 17986–17994, 2013.
- GOLDSTEIN-PIEKARSKI, A. N. et al. Mapping Neural Circuit Biotypes to Symptoms and Behavioral Dimensions of Depression and Anxiety. **Biological Psychiatry**, n. 2, p. 1–11, 2021.
- GORDON, J. A. State-Dependent Alterations in Hippocampal Oscillations in Serotonin 1A Receptor-Deficient Mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 28, p. 6509–6519, 2005.
- GOUTAGNY, R.; JACKSON, J.; WILLIAMS, S. Self-generated theta oscillations in the hippocampus. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 12, p. 1491–1493, dez. 2009.
- GRAEFF, F. G. et al. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 54, n. 1, p. 129–141, 1996.
- GRASYÁN, E. et al. Hippocampal electrical activity during the development of conditioned reflexes. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**, v. 11, n. 3, p. 409–430, 1959.
- GRASYÁN, E. et al. Hypothalamic Motivational Processes as Reflected by their Hippocampal Electrical Correlates. **Science**, v. 149, n. 3679, p. 91–93, 1965.
- GRAY, J. A. **The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**. New York: Clarendon Press/Oxford University Press, 1982.
- GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the function of the septo-hippocampal system**. 2a. ed. New York: Oxford University Press, USA, 2000.
- GREEN, J. D.; ARDUINI, A. A. Hippocampal electrical activity in arousal. **J Neurophysiol**, v. 17, n. 6, p. 533–57, 1954.
- GURURAJAN, A. et al. The future of rodent models in depression research. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 11, p. 686–701, 2019.
- HAN, M. H.; NESTLER, E. J. Neural Substrates of Depression and Resilience. **Neurotherapeutics**, v. 14, n. 3, p. 677–686, 1 jul. 2017.
- HARRIS, A. Z.; GORDON, J. A. Long-range neural synchrony in behavior. **Annual Review of Neuroscience**, v. 38, n. 1, p. 171–194, 2015.
- HEADLEY, D. B. et al. Embracing Complexity in Defensive Networks. **Neuron**, v. 103, n. 2, p. 189–201, 17 jul. 2019.
- HEGDE, P. et al. Chronic stress-induced changes in REM sleep on  $\theta$  oscillations in the rat hippocampus and amygdala. **Brain research**, v. 1382, p. 155–164, 25 mar. 2011.
- HERRY, C. et al. Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. **Nature**, v. 454, n. 7204, p. 600–606, 31 jul. 2008.
- HERWEG, N. A.; SOLOMON, E. A.; KAHANA, M. J. Theta Oscillations in Human Memory. **Trends in cognitive sciences**, v. 24, n. 3, p. 208–227, 1 mar. 2020.
- HESS W. R.; BRÜGGER, M. Das subkortikale Zentrum der affektiven Abwehrreaktion. **Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta**, v. 1, n. 1, p. 33–52, 1943.
- HEY, T.; TANSLEY, S.; TOLLE, K. **The Fourth Paradigm: Data-Intensive Scientific Discovery**. Redmond: Microsoft Research, 2009.
- HÖLSCHER, C.; ANWYL, R.; ROWAN, M. J. Stimulation on the Positive Phase of Hippocampal Theta Rhythm Induces Long-Term Potentiation That Can Be Depotentiated by Stimulation on the Negative Phase in Area CA1 In Vivo. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 16, p. 6470–6477, 1997.
- HULTMAN, R. et al. Brain-wide electrical spatiotemporal dynamics encode depression vulnerability. **Cell**, v. 173, n. 1, p. 166–180.e14, 2018.

- HUNSPERGER, R. W. Role of substantia grisea centralis mesencephali in electrically-induced rage reactions. **Progress in neurobiology**, n. 2, p. 289–294, 1956.
- HYMAN, J. M. et al. Stimulation in hippocampal region CA1 in behaving rats yields long-term potentiation when delivered to the peak of theta and long-term depression when delivered to the trough. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 37, p. 11725–31, 2003.
- INSEL, T. et al. Research Domain Criteria (RDoC): Toward a new classification framework for research on mental disorders. **American Journal of Psychiatry**, 2010.
- JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. [Stress, depression and the hippocampus]. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 25 Suppl 2, n. SUPPL. 2, p. 46–51, 2003.
- JOSEPHSON, C. B.; WIEBE, S. Precision Medicine: Academic dreaming or clinical reality? **Epilepsia**, v. 62 Suppl 2, n. S2, p. S78–S89, 1 mar. 2021.
- JUNG, R.; KORNMÜLLER, A. E. Eine Methodik der Ableitung lokalisierter Potentialschwankungen aus subcorticalen Hirngebieten. **Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten**, v. 109, n. 1, p. 1–30, 1 nov. 1938.
- KAHANA, M. J.; SEELIG, D.; MADSEN, J. R. Theta returns. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, n. 6, p. 739–744, 2001.
- KALISCH, R.; MÜLLER, M. B.; TÜSCHER, O. A conceptual framework for the neurobiological study of resilience. **The Behavioral and Brain Sciences**, v. 38, p. e92, 2015.
- KARAKAŞ, S. A review of theta oscillation and its functional correlates. **International journal of psychophysiology**, v. 157, p. 82–99, 1 nov. 2020.
- KARALIS, N. et al. 4-Hz oscillations synchronize prefrontal-amygdala circuits during fear behavior. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 605–612, 2016.
- KARALIS, N.; SIROTA, A. Breathing coordinates limbic network dynamics underlying memory consolidation. **bioRxiv**, p. 392530, 16 ago. 2018.
- KELLY, J. R. et al. Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. **Journal of Psychiatric Research**, v. 82, p. 109–118, 1 nov. 2016.
- KENDLER, K. S. The Phenomenology of Major Depression and the Representativeness and Nature of DSM Criteria. **American Journal of Psychiatry**, v. 173, n. 8, p. 771–780, 3 maio 2016.
- KESSLER, R. C. et al. Prevalence and Treatment of Mental Disorders, 1990 to 2003. **New England Journal of Medicine**, 2005.
- KIM, Y.; WOOD, J.; MOGHADDAM, B. Coordinated activity of ventral tegmental neurons adapts to appetitive and aversive learning. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e29766, 2012.
- KING, A. Neurobiology: Rise of resilience. **Nature**, v. 531, n. 7592, p. S18–S19, mar. 2016.
- KONG, E. et al. Learning not to fear: Neural correlates of learned safety. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 3, p. 515–27, 2014.
- KOOLHAAS, J. M. et al. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 5, p. 1291–1301, 2011.
- KOROTKOVA, T. et al. Reconciling the different faces of hippocampal theta: The role of theta oscillations in cognitive, emotional and innate behaviors. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 85, n. January 2017, p. 65–80, 2018.
- KRAMIS, R.; VANDERWOLF, C. H.; BLAND, B. H. Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: relations to behavior and

- effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. **Experimental neurology**, v. 49, n. 1 Pt 1, p. 58–85, 1975.
- KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894–902, 2008.
- KYRIAZI, P.; HEADLEY, D. B.; PARÉ, D. Different Multidimensional Representations across the Amygdalo-Prefrontal Network during an Approach-Avoidance Task. **Neuron**, v. 107, n. 4, p. 717- 730.e5, 19 ago. 2020.
- LAMMEL, S.; TYE, K. M.; WARDEN, M. R. Progress in understanding mood disorders: Optogenetic dissection of neural circuits. **Genes, Brain and Behavior**, v. 13, n. 1, p. 38–51, 2014.
- LARSON, J.; MUNKÁCSY, E. Theta-burst LTP. **Brain research**, v. 1621, p. 38–50, 24 set. 2015.
- LARSON, J.; WONG, D.; LYNCH, G. Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. **Brain research**, v. 368, n. 2, p. 347–350, 19 mar. 1986.
- LAZARUS, R. S. From Psychological Stress to the Emotions: A History of Changing Outlooks. **Annual Review of Psychology**, v. 44, p. 1–22, 28 nov. 1993.
- LAZARUS, R. S.; FOLKMAN, S. **Stress, Appraisal, and Coping**. New York: Springer, 1984.
- LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23, p. 155–184, 2000.
- LEDOUX, J. E. et al. The birth, death and resurrection of avoidance: A reconceptualization of a troubled paradigm. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 1, p. 24–36, 2017.
- LEDOUX, J. E.; GORMAN, J. M. A call to action: Overcoming anxiety through active coping. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 12, p. 1953–1955, 1 dez. 2001.
- LESTING, J. et al. Patterns of coupled theta activity in amygdala-hippocampal-prefrontal cortical circuits during fear extinction. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21714, 2011.
- LESTING, J. et al. Directional theta coherence in prefrontal cortical to amygdalo-hippocampal pathways signals fear extinction. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 17–19, 2013.
- LEVINE, S.; URSIN, H. What is stress? In: M.R. BROWN, C. RIVIER, G. K. (Ed.). . **Stress. Neurobiology and Neuroendocrinology**. New York: Marcel Decker, 1991. p. 3–21.
- LIKHTIK, E. et al. Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 106–113, 2014.
- LIKHTIK, E.; PAZ, R. Amygdala–prefrontal interactions in (mal)adaptive learning. **Trends in Neurosciences**, v. 38, n. 3, p. 158–166, 1 mar. 2015.
- LIVNEH, U.; PAZ, R. Amygdala-prefrontal synchronization underlies resistance to extinction of aversive memories. **Neuron**, v. 75, n. 1, p. 133–142, 2012.
- LUBENOV, E. V.; SIAPAS, A. G. Hippocampal theta oscillations are travelling waves. **Nature**, v. 459, n. 7246, p. 534–539, 2009.
- M. AGHAJAN, Z. et al. Theta Oscillations in the Human Medial Temporal Lobe during Real-World Ambulatory Movement. **Current Biology**, v. 27, n. 24, p. 3743-3751.e3, 18 dez. 2017.
- MAIER, S. F. et al. Stressor Controllability and the Pituitary-Adrenal System. **Behavioral Neuroscience**, v. 100, n. 5, p. 669–674, 1986.
- MAIER, S. F.; SELIGMAN, M. E. P. Learned helplessness: theory and evidence.

- Journal of Experimental Psychology**, v. 105, n. 1, p. 1–56, 1976.
- MAIER, S. F.; SELIGMAN, M. E. P. Learned helplessness at fifty: Insights from neuroscience. **Psychological Review**, v. 123, n. 4, p. 1–19, 2016.
- MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Stressor controllability, anxiety, and serotonin. **Cognitive Therapy and Research**, v. 22, n. 6, p. 595–613, 1998.
- MARQUES, D. B. **Influência da controlabilidade sobre o estresse na atividade eletrofisiológica do córtex pré-frontal medial e hipocampo dorsal em ratos: possíveis indicadores de resiliência e desamparo aprendidos.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.
- MARQUES, D. B. et al. A Distinctive Pattern of Hippocampal-Prefrontal Cortical Network Activity during Stress Predicts Learned Resistance. **bioRxiv**, p. 801365, 2019.
- MASON, J. W. A historical view of the stress field. **Journal of Human Stress**, v. 1, n. 2, p. 22–36, 1975.
- MASTEN, A. S. Ordinary magic. Resilience processes in development. **The American psychologist**, v. 56, n. 3, p. 227–238, 2001.
- MATSUDA, Y. et al. Chronic antidepressant treatment rescues abnormally reduced REM sleep theta power in socially defeated rats. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.
- MAYBERG, H. S. et al. Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression. **Neuron**, v. 45, n. 5, p. 651–660, 3 mar. 2005.
- MCEWEN, B. S. et al. Mechanisms of stress in the brain. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1353–1363, 2015.
- MCEWEN, B. S. From serendipity to clinical relevance: How clinical psychology and neuroscience converged to illuminate psychoneuroendocrinology. **Psychoneuroendocrinology**, v. 105, n. June, p. 36–43, 2019.
- MCNAUGHTON, N. Fear, anxiety and their disorders: Past, present and future neural theories. **Psychology and Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 173–181, 2011.
- MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: Fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 285–305, 2004.
- MCNAUGHTON, N.; KOCSIS, B.; HAJÓS, M. Elicited hippocampal theta rhythm: A screen for anxiolytic and procognitive drugs through changes in hippocampal function? **Behavioural Pharmacology**, v. 18, n. 5–6, p. 329–346, 2007.
- MECCA, F. F. Efeitos do antidepressivo escitalopram na atividade eletrofisiológica córtico-amigdalár durante o modelo triádico do desamparo aprendido em ratos Wistar. p. 1–69, 2019.
- MEHRABIAN, A. **Basic dimensions for a general psychological theory: implications for personality, social, environmental, and developmental studies.** Cambridge: Oelgeschlager, Gunn & Hain, 1980.
- MENON, V. Large-scale brain networks and psychopathology: A unifying triple network model. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 15, n. 10, p. 483–506, 2011.
- MERRIAM-WEBSTER. **Resilience Definition & Meaning - Merriam-Webster.** Disponível em: <<https://www.merriam-webster.com/dictionary/resilience>>. Acesso em: 13 jan. 2022.
- MESQUITA, B. D. A. **Caracterização da capacidade de discriminação entre estímulos aversivos controláveis e incontrolláveis em ratos.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2020.
- MIKULOVIC, S. et al. Ventral hippocampal OLM cells control type 2 theta oscillations and response to predator odor. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3638,

- 2018.
- MILAD, M. R.; QUIRK, G. J. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. **Nature**, v. 420, n. 6911, p. 70–74, 7 nov. 2002.
- MILAD, M. R.; QUIRK, G. J. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. **Annual review of psychology**, v. 63, p. 129–151, 2012.
- MIRANDA, L. et al. Systematic Review of Functional MRI Applications for Psychiatric Disease Subtyping. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, p. 1712, 22 out. 2021.
- NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of Depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13–25, 28 mar. 2002.
- NOBEL PRIZE. **Arvid Carlsson - Nobel Lecture: A Half-Century of Neurotransmitter Research: Impact on Neurology and Psychiatry**. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2000/carlsson/lecture/>>. Acesso em: 13 jan. 2022.
- NOVEMBRE, J. et al. Genes mirror geography within Europe. **Nature**, v. 456, n. 7218, p. 98–101, 31 ago. 2008.
- NUÑEZ, A.; BUÑO, W. The Theta Rhythm of the Hippocampus: From Neuronal and Circuit Mechanisms to Behavior. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, 2021.
- O'KEEFE, J.; RECCE, M. L. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. **Hippocampus**, v. 3, n. 3, p. 317–330, 1993.
- O'NEILL, P. K.; GORDON, J. A.; SIGURDSSON, T. Theta oscillations in the medial prefrontal cortex are modulated by spatial working memory and synchronize with the hippocampus through its ventral subregion. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 35, p. 14211–24, 2013.
- OKONOGI, T.; SASAKI, T. Theta-Range Oscillations in Stress-Induced Mental Disorders as an Oscillotherapeutic Target. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 15, 9 jun. 2021.
- OLDS, J.; MILNER, P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 47, n. 6, p. 419–427, dez. 1954.
- OLIVEIRA-JÚNIOR, B. **Caracterização comportamental multivariada de fenótipo do tipo depressivo em ratos submetidos a choques inescapáveis**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2019.
- OSTROFF, L. E. et al. Fear and safety learning differentially affect synapse size and dendritic translation in the lateral amygdala. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 20, p. 9418–9423, 18 maio 2010.
- PADILLA-COREANO, N. et al. Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. **Neuron**, v. 89, n. 4, p. 857–866, 2016.
- PADILLA-COREANO, N. et al. Hippocampal-Prefrontal Theta Transmission Regulates Avoidance Behavior. **Neuron**, v. 104, n. 3, p. 601–610.e4, 2019.
- PAPE, H. C. et al. Theta activity in neurons and networks of the amygdala related to long-term fear memory. **Hippocampus**, v. 15, n. 7, p. 874–880, 2005.
- PAPE, H. C.; PARE, D. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. **Physiological reviews**, v. 90, n. 2, p. 419–463, 2010.
- PARÉ, D.; COLLINS, D. R. Neuronal correlates of fear in the lateral amygdala: multiple extracellular recordings in conscious cats. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 7, p. 2701–10, 1 abr. 2000.



- PATON, J. J. et al. The primate amygdala represents the positive and negative value of visual stimuli during learning. **Nature**, v. 439, n. 7078, p. 865–870, 2006.
- PIGNATELLI, M.; BEYELER, A.; LEINEKUGEL, X. Neural circuits underlying the generation of theta oscillations. **Journal of physiology, Paris**, v. 106, n. 3–4, p. 81–92, maio 2012.
- PIZZAGALLI, D. A. Depression, Stress, and Anhedonia: Toward a Synthesis and Integrated Model. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 10, 2014.
- POLLAK, D. D. et al. An Animal Model of a Behavioral Intervention for Depression. **Neuron**, v. 60, n. 1, p. 149–161, 2008.
- POLLAK, D. D. et al. A translational bridge between mouse and human models of learned safety. **Annals of Medicine**, v. 42, n. 2, p. 115–22, 2010.
- POLLAK, D. D.; MONJE, F. J.; LUBEC, G. The learned safety paradigm as a mouse model for neuropsychiatric research. **Nature Protocols**, v. 5, n. 5, p. 954–62, 2010.
- POST, R. J.; WARDEN, M. R. Melancholy, anhedonia, apathy: the search for separable behaviors and neural circuits in depression. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 49, p. 1–9, 2018.
- POST, R. M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **The American Journal of Psychiatry**, v. 149, n. 8, p. 999–1010, 1992.
- QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural Mechanisms of Extinction Learning and Retrieval. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 56–72, 19 set. 2007.
- REIS, F. M. C. V. et al. Dorsal periaqueductal gray ensembles represent approach and avoidance states. **eLife**, v. 10, n. e64934, 2021.
- RESCORLA, R. A. Conditioned inhibition of fear resulting from negative CS-US contingencies. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 67, n. 4, p. 504–9, 1969a.
- RESCORLA, R. A. Pavlovian conditioned inhibition. **Psychological Bulletin**, v. 72, n. 2, p. 77–94, ago. 1969b.
- RESCORLA, R. A. Summation and retardation tests of latent inhibition. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 75, n. 1, p. 77–81, 1971.
- RESCORLA, R. A.; LOLORDO, V. M. Inhibition of avoidance behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 59, n. 3, p. 406–412, 1965.
- RESCORLA, R. A.; WAGNER, A. R. A Theory of Pavlovian Conditioning: Variations in the Effectiveness of Reinforcement and Nonreinforcement. **Classical conditioning II: current research and theory**, p. 64–99, 1972.
- REYNOLDS, S. M.; BERRIDGE, K. C. Emotional environments retune the valence of appetitive versus fearful functions in nucleus accumbens. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 4, p. 423–425, abr. 2008.
- ROGAN, M. T. et al. Distinct neural signatures for safety and danger in the amygdala and striatum of the mouse. **Neuron**, v. 46, n. 2, p. 309–320, 2005.
- ROSSIGNOLI, M. T. **Estudo da atividade eletrofisiológica córtico-amigdalár durante o modelo triádico do desamparo aprendido em ratos.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2018.
- ROTTER, J. B. Generalized expectancies for internal versus external control of reinforcement. **Psychological monographs**, v. 80, n. 1, p. 1–28, 1966.
- ROYER, S. et al. Distinct representations and theta dynamics in dorsal and ventral hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 5, p. 1777–1787, 2010.
- RUGGIERO, R. N. et al. Neuromodulation of Hippocampal-Prefrontal Cortical Synaptic Plasticity and Functional Connectivity: Implications for Neuropsychiatric

- Disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, n. October, p. 1–23, 11 out. 2021.
- RUSSELL, J. A.; BARRETT, L. F. Core affect, prototypical emotional episodes, and other things called emotion: Dissecting the elephant. **Journal of Personality and Social Psychology**, v. 76, n. 5, p. 805–819, maio 1999.
- RUSSO, S. J. et al. Neurobiology of resilience. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 1475–1484, 2012.
- SAINSBURY, R. S. Hippocampal theta: A sensory-inhibition theory of function. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 2, p. 237–241, 1998.
- SAMUEL, A. L. Some Studies in Machine Learning Using the Game of Checkers. **IBM Journal of Research and Development**, v. 3, n. 3, p. 210–229, jul. 1959.
- SANGHA, S.; CHADICK, J. Z.; JANAK, P. H. Safety encoding in the basal amygdala. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 9, p. 3744–3751, 27 fev. 2013.
- SANTOMAURO, D. F. et al. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, v. 398, n. 10312, p. 1700–1712, 6 nov. 2021.
- SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, 1 fev. 2000.
- SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **The American Journal of Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509–22, 1965.
- SEIDENBECHER, T. et al. Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 846–850, 2003.
- SELIGMAN, M. E.; CSIKSZENTMIHALYI, M. Positive psychology: An introduction. **American Psychologist**, v. 55, n. 1, p. 5, 2000.
- SELIGMAN, M. E. P. **Helplessness: on depression, development, and death**. San Francisco, CA: W. H. Freeman, 1975.
- SELIGMAN, M. E. P. **The hope circuit: a psychologist's journey from helplessness to optimism**. New York: PublicAffairs, 2018.
- SELIGMAN, M. E. P.; MAIER, S. F. Failure to escape traumatic shock. **Journal of Experimental Psychology**, v. 74, n. 1, p. 1–9, 1967.
- SELYE, H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. **Nature**, v. 138, n. 3479, p. 32–32, 1936.
- SELYE, H. Confusion and controversy in the stress field. **Journal of Human Stress**, v. 1, n. 2, p. 37–44, 1975.
- SENN, V. et al. Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. **Neuron**, v. 81, n. 2, p. 428–437, 22 jan. 2014.
- SHAROT, T. The optimism bias. **Current biology**, v. 21, n. 23, 6 dez. 2011.
- SHORS, T. J. et al. Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation in the rat hippocampus. **Science**, v. 244, n. 4901, p. 224–226, 1989.
- SHORS, T. J. et al. Unpredictable and uncontrollable stress impairs neuronal plasticity in the rat hippocampus. **Brain Research Bulletin**, v. 24, n. 5, p. 663–667, 1990.
- SIAPAS, A. G.; LUBENOV, E. V.; WILSON, M. A. Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. **Neuron**, v. 46, n. 1, p. 141–151, 2005.
- SIERRA-MERCADO, D.; PADILLA-COREANO, N.; QUIRK, G. J. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 2, p. 529–538, jan. 2011.
- SIGURDSSON, T.; DUVARCI, S. Hippocampal-prefrontal interactions in cognition,

- behavior and psychiatric disease. **Frontiers in Systems Neuroscience**, 2016.
- SKLAR, L. S.; ANISMAN, H. Stress and coping factors influence tumor growth. **Science**, v. 205, n. 4405, p. 513–515, 1979.
- SOLOMON, A. **O demônio do meio-dia: uma anatomia da depressão**. 2a. ed. São Paulo: Companhia das Letras, 2014.
- SOTRES-BAYON, F.; QUIRK, G. J. Prefrontal control of fear: more than just extinction. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 20, n. 2, p. 231–235, 2010.
- SOUTHWICK, S. M. et al. Resilience definitions, theory, and challenges: interdisciplinary perspectives. **European Journal of Psychotraumatology**, v. 5, 1 out. 2014.
- SOUTHWICK, S. M. et al. Resilience: The role of accurate appraisal, thresholds, and socioenvironmental factors. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 38, p. e122, 2015.
- SOUTHWICK, S. M.; CHARNEY, D. S. The science of resilience: implications for the prevention and treatment of depression. **Science**, v. 338, n. 6103, p. 79–82, 2012.
- SOUTHWICK, S. M.; VYTHILINGAM, M.; CHARNEY, D. S. The Psychobiology of Depression and Resilience to Stress: Implications for Prevention and Treatment. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 1, n. 1, p. 255–291, 2005.
- STUJENSKE, J. M. et al. Fear and Safety Engage Competing Patterns of Theta-Gamma Coupling in the Basolateral Amygdala. **Neuron**, v. 83, n. 4, p. 919–933, 2014.
- THÉRIAULT, R. K.; MANDUCA, J. D.; PERREAULT, M. L. Sex differences in innate and adaptive neural oscillatory patterns link resilience and susceptibility to chronic stress in rats. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 46, n. 2, p. E258–E270, 2021.
- TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 317–331, 2015.
- TYE, K. M. et al. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. **Nature**, v. 493, n. 7433, p. 537–541, 2013.
- TYE, K. M. Neural Circuit Motifs in Valence Processing. **Neuron**, v. 100, n. 2, p. 436–452, 24 out. 2018.
- VAN DER MEER, M. A. A.; REDISH, A. D. Theta phase precession in rat ventral striatum links place and reward information. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 8, p. 2843–54, 2011.
- VANDERWOLF, C. H. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**, v. 26, p. 407–418, 1969.
- VARELA, F. et al. The brainweb: Phase synchronization and large-scale integration. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 229–239, 2001.
- VERTES, R. P.; HOOVER, W. B.; VIANA DI PRISCO, G. Theta rhythm of the hippocampus: subcortical control and functional significance. **Behavioral and cognitive neuroscience reviews**, v. 3, n. 3, p. 173–200, 2004.
- VERTES, R. P.; KOCSIS. Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. **Neuroscience**, v. 81, n. 4, p. 893–926, 1997.
- VOYTEK, B.; KNIGHT, R. T. Dynamic network communication as a unifying neural basis for cognition, development, aging, and disease. **Biological psychiatry**, v. 77, n. 12, p. 1089–1097, 15 jun. 2015.
- VU, M.-A. T. et al. A Shared Vision for Machine Learning in Neuroscience. **The Journal**

- of **Neuroscience**, v. 38, n. 7, p. 1601–1607, 2018.
- WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322–328, mar. 2007.
- WARDEN, M. R. et al. A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. **Nature**, v. 492, n. 7429, p. 428–432, 2012.
- WATSON, D.; TELLEGEN, A. Toward a consensual structure of mood. **Psychological Bulletin**, v. 98, n. 2, p. 219, set. 1986.
- WEISS, J. A. Y. M. Effects of coping responses on stress. **Physiological Psychology**, v. 65, n. 2, p. 251–260, 1968.
- WEISS, J. M. Effects of coping behavior in different warning signal conditions on stress pathology in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 77, n. 1, p. 1–13, out. 1971.
- WEISS, J. M. Psychological factors in stress and disease. **Scientific American**, v. 226, n. 6, p. 104–113, 1972.
- WERNER, E. E.; BIERMAN, J. M.; FRENCH, F. E. **The Children of Kauai: A Longitudinal Study from the Prenatal Period to Age Ten**. 1. ed. Honolulu: University of Hawaii Press, 1971.
- WERNER, E. E.; SMITH, R. S. **Vulnerable but Invincible. A Longitudinal Study of Resilient Children and Youth**. New York: McGraw-Hill, 1982.
- WHISHAW, I. Q.; VANDERWOLF, C. H. Hippocampal EEG and behavior: Change in amplitude and frequency of RSA (Theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats. **Behavioral Biology**, v. 8, n. 4, p. 461–484, 1973.
- WHO. **Depression**. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/depression#>>. Acesso em: 14 jan. 2022.
- WIDGE, A. S. et al. Electroencephalographic biomarkers for treatment response prediction in major depressive illness: A meta-analysis. **The American Journal of Psychiatry**, v. 176, n. 1, p. 44–56, 2019.
- WILLIAMS, L. M. Precision psychiatry: A neural circuit taxonomy for depression and anxiety. **The Lancet Psychiatry**, v. 3, n. 5, p. 472–80, 2016.
- WORLEY, N. B. et al. Functional networks activated by controllable and uncontrollable stress in male and female rats. **Neurobiology of Stress**, v. 13, p. 100233, 2020.
- WUNDT, W. Outlines of Psychology. In: RIEBER, R. W. (Ed.). **Wilhelm Wundt and the Making of a Scientific Psychology**. Boston, MA: Springer, 1980. p. 179–195.
- ZHENG, C.; ZHANG, T. Synaptic plasticity-related neural oscillations on hippocampus-prefrontal cortex pathway in depression. **Neuroscience**, v. 292, p. 170–180, 2015.

## **6. APÊNDICE - Desenvolvimento de sistemas de registro para estudo da relação entre oscilações neurais e comportamentos inatos relevantes para depressão**

Danilo Benette Marques, Bruno de Avó Mesquita, Benedito de Oliveira-Júnior; Leonardo Rakauskas Zacharias, Matheus Teixeira Rossignoli, Rafael Naime Ruggiero; João Pereira Leite.

### **Introdução**

Modelos animais são fundamentais para a compreensão da neurobiologia da depressão e da resiliência. Embora nesta tese tenhamos focado em desenhos experimentais que modelam respostas aprendidas, comportamentos inatos são amplamente usados para avaliação de intervenções que modelam a etiologia e tratamentos da depressão clínica em roedores (WILLNER, 1984; WILLNER; SCHEEL-KRÜGER; BELZUNG, 2013). Neste sentido, os testes comportamentais que mais se destacam são o teste do nado forçado, o teste de preferência por sacarose e o teste de interação social. Os estados comportamentais quantificados nestes testes são interpretados como revelando estilos de enfrentamento ativo ou passivo, integridade no processamento de recompensas ou anedonia e motivação *versus* apatia social (FILE; SETH, 2003; KRISHNAN et al., 2007; LIU et al., 2018; SLATTERY; CRYAN, 2012), os quais representam domínios centrais alterados na depressão maior (GURURAJAN et al., 2019). Apesar de estes comportamentos já terem sido vastamente explorados do ponto de vista neuroquímico e neuroanatômico, ainda pouco se sabe sobre o envolvimento de oscilações neurais.

Nesta etapa, tivemos o objetivo de desenvolver sistemas de registros comportamental e eletrofisiológico simultâneos para investigação da relação temporal fina entre estados comportamentais e oscilações neurais. Para isso, buscamos desenvolver dispositivos capazes de transduzir atividade comportamental em sinais elétricos para registro concomitante ao de potenciais de campo locais. Uma possível associação entre comportamentos e oscilações neurais poderia já ser indicada se eventos comportamentais nestes testes apresentassem periodicidade. Portanto, investigamos possível propriedade rítmica destes comportamentos por meio de técnicas de processamento e análise de sinal típicas em eletrofisiologia. A seguir, apresentaremos as descrições dos sistemas, dos dispositivos e das análises

desenvolvidas, bem como resultados preliminares demonstrando a eficácia dos registros comportamentais e evidência de que os comportamentos de interesse possuem natureza rítmica na faixa de 4-12 Hz, indicando possível associação com as oscilações teta.

## **Material e métodos**

### **Sujeitos**

5 ratos Sprague-Dawley adultos (7-8 semanas de idade, Ribeirão Preto, Brasil) foram alojados individualmente em gaiolas com maravalha em uma sala com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) em um ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 7:00) com acesso *ad libitum* à comida e água. 3 Machos reprodutores aposentados também foram utilizados como intrusos dominantes. Os procedimentos seguiram as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais local (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, protocolo 0004/2020).

### **Implante de eletrodos**

Os animais foram submetidos a implante crônico múltiplo de eletrodos como descrito no artigo II desta tese.

### **Sistema de registro**

Para registro simultâneo de sinais eletrofisiológicos e comportamentais utilizamos o sistema de registro Open Ephys Acquisition Board (Open Ephys Production Site, EUA) e o software de código aberto Open Ephys GUI. Criamos dispositivos que transduziam atividade comportamental em sinais elétricos, os quais entravam por canais analógicos adicionais ao sistema por meio de uma placa de entrada/saída (BNC/HDMI) customizada. Utilizamos um cabo RHD de interface SPI (Intan Technologies, EUA) e um *headstage* Intan RHD2132 (Intan Technologies, EUA) com acelerômetro tridimensional (ADXL335) embutido. Usamos uma placa de circuito elétrico customizada (15 mm de altura) como adaptador entre o conector Omnetics de 8 canais (modelo A12623-001; Omnetics, EUA) do implante e o conector Omnetics de 32 canais (modelo A79022-001; Omnetics, EUA) do *headstage*. Todos os sinais foram

registrados em 1000 Hz. Potenciais de campo locais foram registrados com ganho de 1000x.

Todas as sessões comportamentais foram filmadas com uma webcam Logitech c270 (Logitech International S.A., Suíça). Para sincronização entre vídeo e sinais usamos uma placa Arduino UNO (Arduino, Itália) programada para emitir 3 pulsos (5V) de 5 s (espaçados por 5 s; 0V) sempre que reiniciada. Os pulsos acionam um LED (0,5 mm) infravermelho (IR) filmado e um canal de registro analógico no Open Ephys. Assim, reiniciamos a placa no início e final de cada experimento e identificamos as marcações temporais *offline* visualmente. Durante a sessão, a placa emitia pulsos de 1 s (espaçados por 1 s) continuamente para auxiliar na sincronização. Foi utilizado o *software* de código aberto BORIS (Behavioral Observation Research Interactive Software) para definição visual das marcações temporais.

### **Testes comportamentais e aparatos**

Os aparatos comportamentais se localizavam dentro de uma gaiola de Faraday de aço inox em malha (1000 mm x 500 mm x 900; Bonther, Brasil), enquanto que os sistemas de aquisição e microcontrolador se localizavam fora. Um sistema de roldanas, barbante e peso foi instalado para permitir movimentação do cabo de registro. Com exceção da caixa familiar, os aparatos comportamentais eram retráteis (Fig. 1B). As peças customizadas (carretel e bobina do nado forçado, suporte para detectores de lambidas e jaula para interação social) e serviços de oficina de precisão foram realizados pela empresa Master One (Master One, Brasil).

#### *Teste do nado forçado*

Implementamos um sistema de indução eletromagnética para registro da atividade motora durante nado forçado (Fig. 1C, 2A). O sistema se baseia na propriedade de que o movimento de materiais magnéticos dentro de uma bobina induz corrente elétrica. Como material magnético, um elástico de cabelo preto foi colado a 10g de ímãs de terras raras (neodímio) com fita isolante líquida, o qual era amarrado na pata esquerda do rato antes da inserção no nado. Não notamos sinais de desconforto dos animais por causa do elástico. Para a bobina, customizamos um suporte de acrílico branco no formato de um carretel (310 mm diâmetro x 100 mm de altura) e enrolamos 4 Kg de fio de cobre esmaltado (26 gauge) deixando as

extremidades do fio expostas. O carretel foi desenvolvido para encaixar na parte externa do cilindro do nado forçado (acrílico transparente; 280 mm de diâmetro x 600 mm de altura; Insight, Brasil) sendo colocado por cima. A altura ótima da bobina era ajustada com peças de acrílico no chão. As extremidades do fio eram inseridas como polos positivo/negativo em um pré-amplificador (P55 A.C. Grass Astro-Med® Inc., EUA) (Fig. 1C). Neste, o sinal era amplificado (100x), filtrado (0.3-30 Hz) e, então, era enviado ao Open Ephys. Também testamos registrar o sinal sem amplificação que, embora não permitisse inspeção visual da qualidade durante o experimento, retornou resultados equivalentes ao do sinal amplificado após processamento.

Para impermeabilização permanente do sistema de registro eletrofisiológico, pintamos o *headstage* e o adaptador entre conectores com várias camadas de borracha líquida (Impertech, Brasil). Além disso, no dia do teste utilizamos um preservativo de uso clínico não lubrificado (Blowtex, Brasil) cortado na ponta e cobrimos o capacete até o início do cabo de registro. Então, um elástico foi fortemente enrolado no entorno do preservativo cobrindo o capacete e fechado com um nó duplo simples. Também enrolamos um elástico na outra ponta do preservativo na altura do início do cabo de registro (Fig. 1C). Antes deste procedimento expomos o animal a isoflurano (Isoforine®; Cristália Ltda., Brasil) em um algodão embebido por alguns minutos e deixamos os animais recuperarem por 15 minutos. Os testes do sistema do nado forçado foram feitos na fase clara. O cilindro foi preenchido com água (25°C) até 20 cm. Para avaliação do sistema de registro comportamental realizamos exposições de 15-30 min. O sistema de ímã e bobina, bem como os métodos de impermeabilização e análise de chutes foram baseados em WARDEN et al, 2012.

#### *Teste de preferência por sacarose*

O aparato de registro comportamental para testes de preferência ou consumo de sacarose foi implementado em um ambiente denominado caixa familiar (Fig. 1D), uma vez que este serviria como contexto já conhecido e seguro para comparação com situações envolvendo estresse. A caixa familiar (320 mm x 390 mm x 800 mm) era feita de madeira com assoalho de borracha preto. Uma das paredes era sua porta, a qual continha uma janela de insulfilm. Aberturas na parte superior permitiam a entrada de cabos de registro, luz e câmera. Um pequeno orifício no centro da parede lateral permitia a inserção do LED IR para sincronização com vídeo (Fig. 1D).





**Figura 1** – Aparatos desenvolvidos. **A**, Dispositivo de entrega de recompensa e detecção de presença por infravermelho usado no artigo II. **B**, Sistema para registros comportamentais e eletrofisiológicos com a caixa familiar (esquerda) e campo aberto (direita). **C**, Sistema de indução eletromagnética (ímã-bobina) usado para registro comportamental no nado forçado. Note o elástico na pata do rato e a impermeabilização. **D**, Detectores de lambida por feixe de infravermelho inseridos na caixa familiar. **E**, Exemplo de configuração durante as etapas do teste de interação social. Note o LED infravermelho no canto superior esquerdo usado para sincronização com registro eletrofisiológico.

Desenvolvemos dois detectores de lambidas (*lickometer*) por sensor óptico (Fig. 1D, 2D). Cada um consistia em um par emissor-sensor de LED (0,5 mm) IR cujo feixe era centralizado rente ao final do bico de sua respectiva mamadeira. A emissão

IR (5V) era realizada constantemente. A emissão e aterramento de ambos os detectores eram integrados na mesma placa Arduino, enquanto os canais correspondentes a cada LED sensor eram enviados a diferentes entradas no Open Ephys. Para instalação dos detectores, duas aberturas foram feitas em uma mesma parede da caixa familiar. Uma peça cilíndrica horizontal de policloreto de vinila (PVC) preto foi moldada para inserção dos LEDs lateralmente e o bico angulado da mamadeira por cima de modo que sua extremidade ficasse rente ao feixe IR. Dois tubos pequenos de plástico preto foram colados sobre os LEDs para estreitar o feixe IR. Estes moldes foram fixados nas aberturas da caixa familiar pela parte externa se integrando a placas de estanho retangulares finas abertas pela parte interna (Fig. 1D). Assim, para beber as soluções os animais deveriam inserir a cabeça nestes orifícios. Por fim, as aberturas ficaram espaçadas entre si em 160 mm, cada abertura tinha 50 mm de diâmetro e 30 mm de profundidade até o acesso às soluções e permitia perturbação do feixe IR pelo movimento da língua.

Os testes do sistema de registro para preferência por sacarose foram realizados na fase escura (19:00 à 1:00) durando entre 2 a 4 horas. O animal testado passou por privação hídrica durante o dia. Testamos os registros usando soluções de 20% contra 0% de sacarose e 1% contra 0% (peso/volume) mudando os lados das mamadeiras ao longo dos dias.

#### *Teste de interação social*

Os testes de interação social foram realizados em um campo aberto com adição de uma jaula customizada (Fig. 1E, 2G). O campo aberto consistia em uma caixa de acrílico transparente (500 mm x 480 mm x 500 mm; Insight, Brasil). A jaula consistia em um assoalho e teto aberto, ambos de PVC marrom, e barras de estanho espaçadas, permitindo interação olfativa. A jaula era quadrangular e permitia pouco movimento do animal inserido (200 mm x 90 mm x 300 mm). Nos testes a jaula era colocada no centro de uma parede e sua base era colada ao assoalho com fita crepe para garantir fixação suficiente (Fig. 1E). Usamos a atividade do acelerômetro de cabeça como estimativa de eventos comportamentais durante a exploração.

Para teste do sistema de registro durante interação social foi feita exposição sequencial do animal apenas ao campo aberto por 15 min, depois 15 min com a jaula

vazia, e, em seguida, com a jaula com o intruso por 60 min (Fig. 1E). Os experimentos foram realizados na fase clara.

### **Análise de sinais comportamentais**

As análises de sinal foram desenvolvidas e realizadas em MATLAB (Mathworks, EUA).

#### *Decomposição tempo-frequência*

Para examinar a relação entre amplitude dos sinais comportamentais e ritmicidade em frequências específicas, fizemos a decomposição tempo-frequência para potência, que é uma abordagem convencional para análises eletrofisiológicas mas pouco utilizada para dados comportamentais. Para isso, realizamos a transformada de Fourier de tempo curto ao longo dos sinais em segmentos de 5 s com 90% de intersecção aplicando janelamento de Hamming e, então, multiplicamos os valores pelo conjugado complexo para obtenção das estimativas de potência e apresentação dos espectrogramas.

Pela inspeção inicial, notamos que os sinais comportamentais, apesar de apresentarem periodicidade, eram não-lineares, isto é, os formatos das ondas não correspondiam perfeitamente a funções senoidais de mesma frequência. Isso acarreta na presença de "harmônicos" de uma frequência central no espectro de potências. Portanto, para identificação precisa dos eventos comportamentais, filtramos os sinais na faixa delimitando a frequência central de cada sinal.

#### *Análise de chutes no nado forçado*

O sinal com perturbações eletromagnéticas induzidas durante nado foi denominado sinal de chutes (*kick signal*). Após inspeção dos espectrogramas observamos que as variações de maior amplitude ocorriam dentro da faixa de 10 Hz. Portanto, filtramos o sinal de 1 a 10 Hz com a rotina *eegfilt* (EEGLAB toolbox). Para identificação dos tempos dos chutes, identificamos os picos dos valores de voltagem acima de 10% do valor máximo do sinal sem restrição de distância mínima.

#### *Análise de lambidas na preferência por sacarose*

Denominamos o sinal de perturbação do sensor IR por movimento da língua de sinal de lambidas (*lick signal*). Para detectar as lambidas, inicialmente identificamos os períodos em que o animal estava bebendo uma ou outra mamadeira. Notamos que o sinal usado para sincronização induzia um ruído de baixa amplitude nos sinais de ambos detectores. Após filtrar os sinais entre 1 e 10 Hz, aplicamos uma convolução de média andante de 1 s em ambos os sinais e subtraímos um do outro. Assim, pudemos identificar os períodos de maior amplitude em uma mamadeira ou outra, por meio dos valores positivos ou negativos. Estabelecemos o limiar de metade do desvio padrão dos valores absolutos dessas diferenças. Então, os valores que ultrapassaram este limiar por mais de 5 s foram considerados episódios de bebida. Em seguida, identificamos picos de voltagem dentro de cada episódio, considerando distância mínima entre picos de 100 ms e altura mínima de 1 desvio padrão das diferenças entre sinais, uma vez que notamos que o sinal apresentava pequenos “picos” no fim de cada lambida. O espectro de potências médio foi calculado a partir da diferença entre sinais filtrados – procedimento que removia ruídos constantes de ambos sinais – durante os episódios de bebida em cada mamadeira

#### *Análise de acelerômetro de cabeça durante interação social*

Como a atividade motora da cabeça é menos relacionada a eventos específicos como lambidas e chutes, filtramos os três sinais acima de 1 Hz e analisamos cada um separadamente. Para categorização de períodos de maior atividade calculamos o vetor resultante (soma dos quadrados) dos três eixos e identificamos os valores acima do limiar de metade do seu desvio padrão. Por fim, obtivemos os espectros de potência médios dos períodos de maior atividade.

## **Resultados e Discussão**

### **Eficácia dos sistemas de registro comportamental e eletrofisiológico**

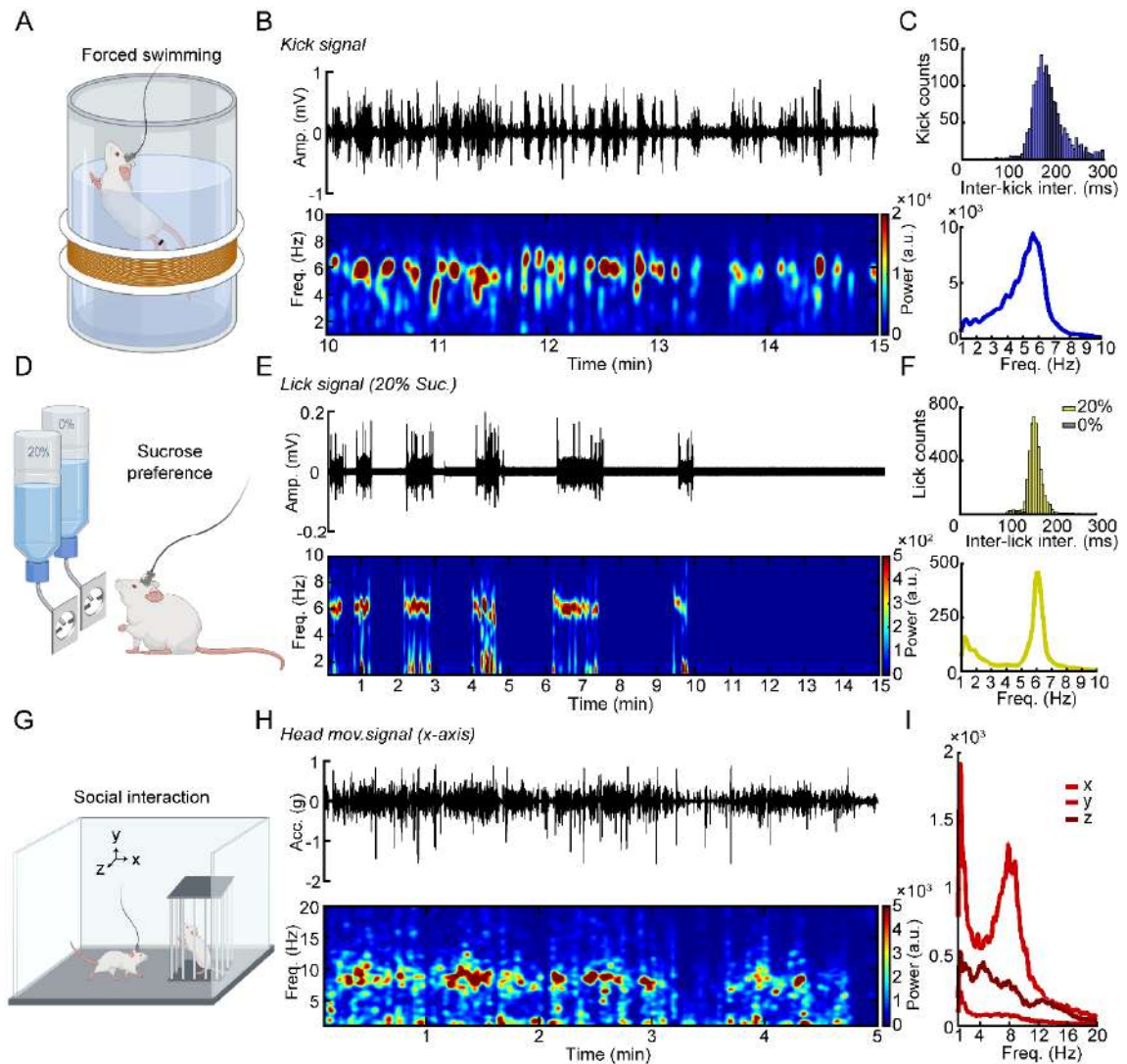
No presente trabalho, conseguimos desenvolver dispositivos em código aberto e de baixo custo para transdução de atividade comportamental em sinais analógicos para registro concomitante à eletrofisiologia (Fig. 1, 2A, D, F). Também estabelecemos métodos de processamento para tais sinais para identificação temporal precisa de eventos comportamentais (chutes no nado e lambidas no consumo de sacarose). O registro em mais animais e comparação com medidas clássicas quantificadas nestes

testes será importante para validação dos sistemas, porém, por inspeção visual durante os testes, testemunhamos uma precisão acurada entre eventos comportamentais e perturbações nos sinais digitais.

Obtivemos registros eletrofisiológicos de qualidade na caixa familiar durante consumo de sacarose e no campo aberto durante interação social (Fig. 4), mas ainda não durante nado forçado, apesar da impermeabilização eficiente. De fato, este era o teste que considerávamos mais desafiador para registro eletrofisiológico simultâneo. Registros de potenciais de campo durante nado já foram reportados na literatura para estudos de navegação espacial (SHIRVALKAR; RAPP; SHAPIRO, 2010; SHIRVALKAR; SHAPIRO, 2010) e translocação (WHISHAW; VANDERWOLF, 1973), enquanto registros de atividade unitária já foram feitos no próprio nado forçado (TYE et al., 2013; WARDEN et al., 2012). Portanto, acreditamos que com um pouco mais de desenvolvimento este registro será viável. Então, combinado com o registro comportamental desenvolvido, este sistema será interessante para estudo das bases neurofisiológicas subjacentes a estados ativos e passivos de enfrentamento ao estresse.

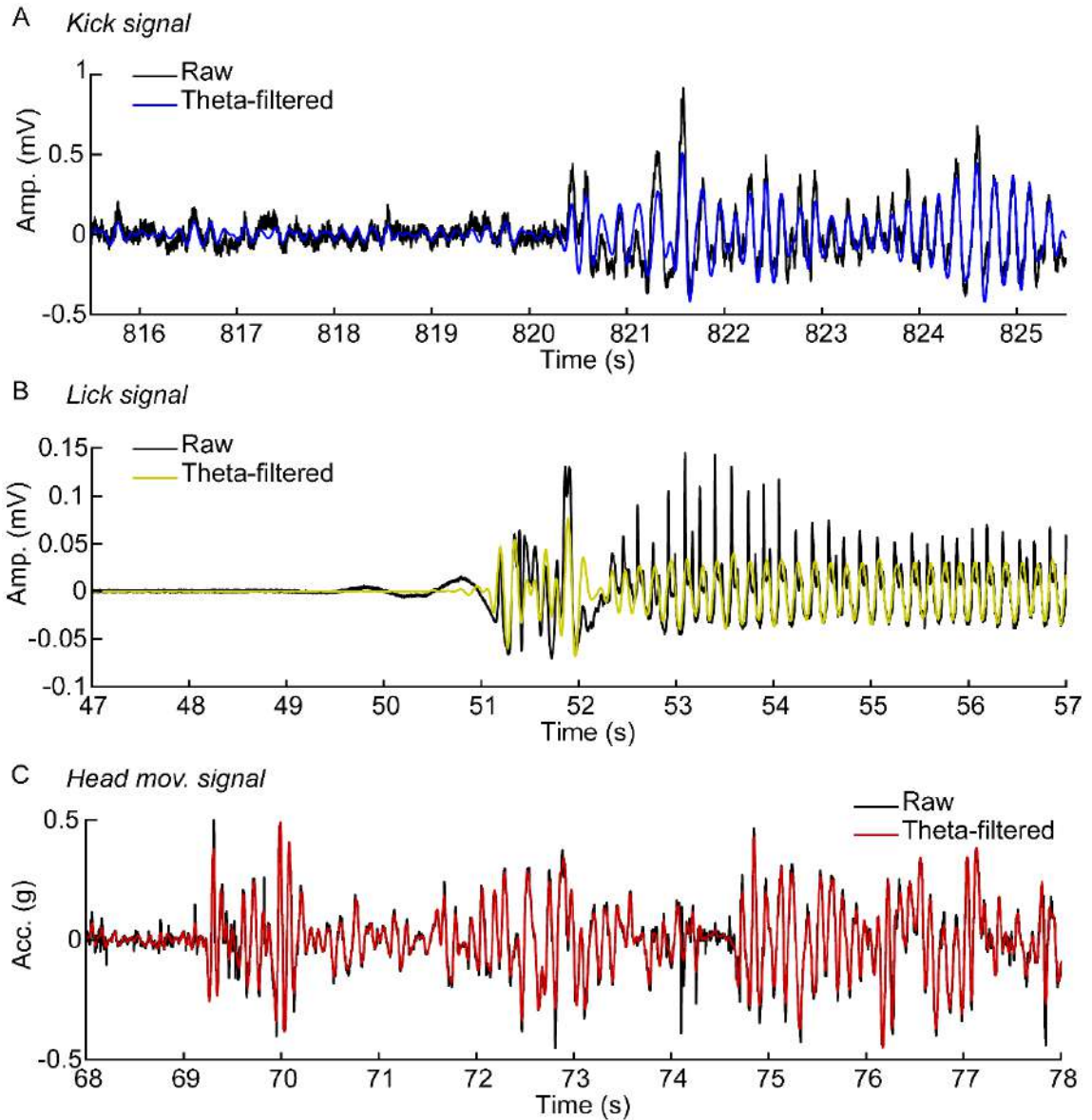
### **Comportamentos de natureza rítmica**

Nós observamos que comportamentos inatos indicativos de resiliência possuem natureza rítmica invariante na faixa de 4-12 Hz. Pela inspeção dos espectrogramas dos sinais comportamentais (Fig. 2B, E, G), notamos que nos períodos de maior amplitude havia maior potência em frequências específicas, variando pouco ao longo da sessão. Junto ao espectro de potências médio, notamos picos em 5,6 Hz para o nado (Fig. 2C), 6,1 Hz para lambidas (Fig. 2F) e 7,8 Hz para movimento da cabeça (Fig. 2I). Examinando os mesmos sinais ampliados, foi possível notar que as flutuações filtradas na faixa de 4-10 Hz correspondiam às maiores variações de amplitude do sinal bruto (Fig. 3). Além disso, a periodicidade dos eventos



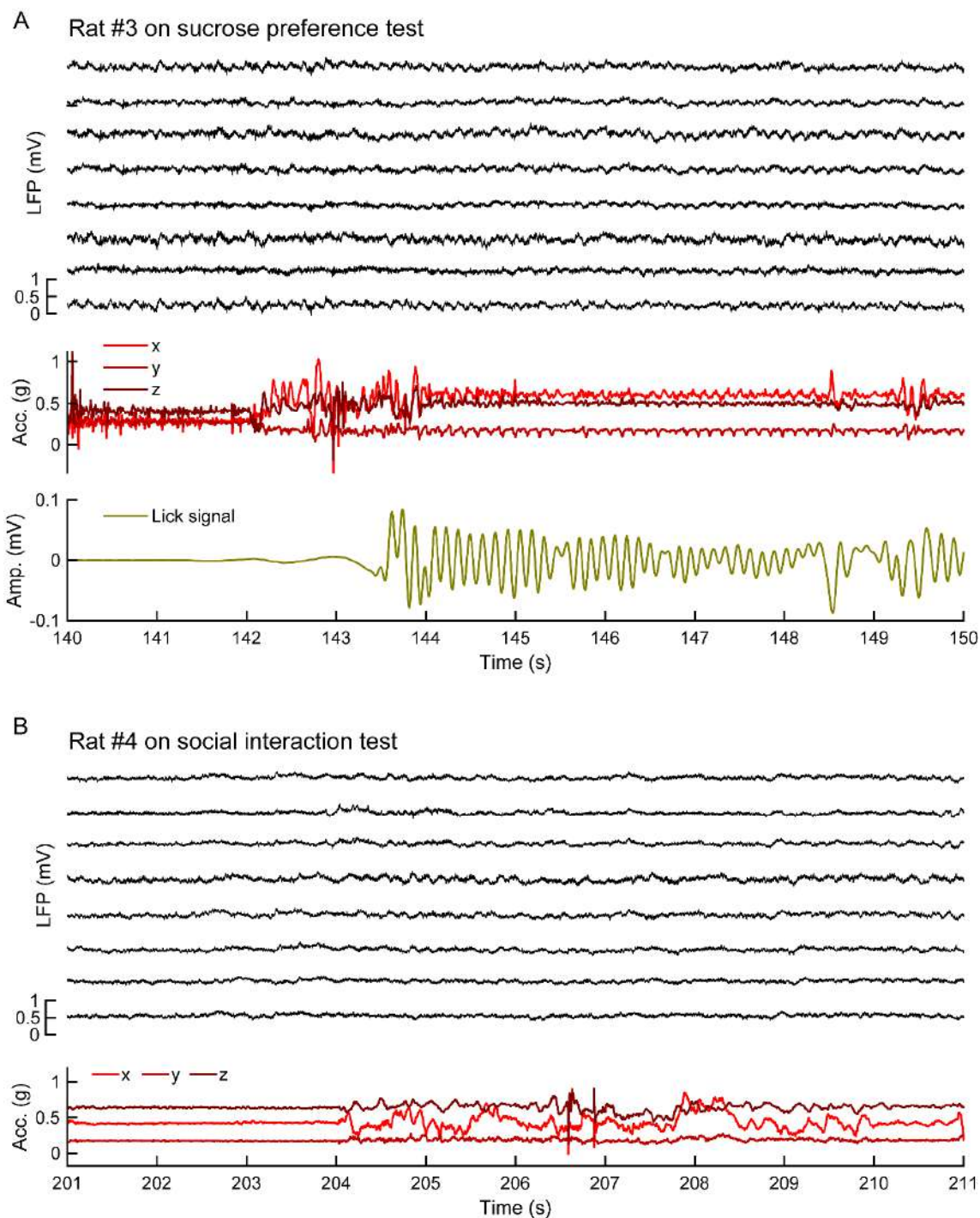
**Figura 2** – Sinais comportamentais registrados durante nado forçado, consumo de sacarose e interação social apresentam natureza rítmica nas frequências de 4-12 Hz. **A, D, G**, Representações gráficas dos dispositivos usados para registro da atividade comportamental. **B, E, H**, Sinais comportamentais mostrando que períodos de maior amplitude estão relacionados a maiores potências na faixa de 4-12 Hz em seus respectivos espectrogramas. Sinais de chute (**B**) e de lambidas (**E**) estão filtrados entre 1 a 10 Hz, enquanto o (**H**) sinal de acelerômetro acima de 1 Hz. (**E**) Sinal de lambidas para mamadeira com 20% de sacarose. **H**, Sinal do acelerômetro de cabeça do eixo x (frontal). Veja também trechos ampliados destes sinais na Figura 3. **C, F, I**, Espectros de potências médios e distribuição de intervalos entre repostas revela periodicidade dos eventos comportamentais. Intervalos entre (**B**) chutes e (**E**) lambidas se concentram entre 160-170 ms. Os picos das potências médias para sinal de (**C**) chutes e (**F**) lambidas se localizam em 5,6 Hz e 6,1 Hz, respectivamente. **H**, Em períodos de atividade durante interação social, apenas a aceleração do eixo x apresenta pico definido de potência em 7,8 Hz. Todos os painéis e médias se referem a uma exposição de um rato (nado forçado: Rato #1; preferência por sacarose: Rato #2, interação social: Rato #4).

comportamentais também foi expressa pela concentração das distribuições de intervalos entre chutes (165-170 ms; Fig. 2C) e lambidas (160-165 ms; Fig. 2F), correspondendo às frequências salientes das análises espectrais.



**Figura 3** – Trechos representativos de sinais comportamentais mostrando atividade na faixa de teta. **A, B, C**, Sinais “brutos” e filtrados em teta (4-10 Hz) para o sinal de **(A)** chutes, **(B)** lambidas e **(C)** acelerômetro de cabeça (eixo x). Os trechos mostram transição para períodos de maior atividade comportamental. Estes trechos são ampliados dos sinais apresentados na Figura 1. O sinal de lambida é a diferença entre sinais filtrados acima de 1 Hz durante bebida em 20% de sacarose. O sinal de acelerômetro é filtrado acima de 1 Hz.

A ritmicidade de lambidas em 7 Hz é bem estabelecida e amplamente amparada na literatura (LIN et al., 2013). Curiosamente, observamos característica oscilatória apenas no eixo x do acelerômetro, que, em nossa configuração, correspondia à direção frontal do animal. Atividade rítmica de acelerômetro de cabeça já foi relatada na literatura, também na mesma faixa de frequência, porém no eixo



**Figura 4** – Exemplos de registros eletrofisiológicos e comportamentais simultâneos durante o (A) teste de preferência por sacarose na caixa familiar e o (B) teste de interação social no campo aberto. **A, B**, Potenciais de campo locais e sinais do acelerômetro estão apresentados sem filtro. **A**, Note, pelos sinais comportamentais, que o registro representa um animal se movimentando até a mamadeira e começando a beber sem afetar os sinais eletrofisiológicos. O sinal de lambidas é a diferença entre sinais filtrados em 1-10 Hz durante bebida em 20% de sacarose. **B**, Note períodos de maior atividade no acelerômetro acompanhadas de variações sutis na atividade oscilatória dos potenciais de campo locais.

vertical (LEDBERG; ROBBE, 2011). Uma vez que, em nosso sistema, o acelerômetro



se localizava mais distante do implante devido ao adaptador entre conectores, é possível que a maior aceleração ocorra em movimentos angulares de frente para trás. Também especulamos que a ritmicidade do acelerômetro corresponda, em parte, aos eventos de “cheirar” durante a exploração olfativa. Eventos de cheiro são melhor identificados com registro de respiração, porém é reportado que estes também apresentam periodicidade próxima à 7 Hz (MACRIDES; EICHENBAUM; FORBES, 1982). Por sua vez, em nosso conhecimento, esta é a primeira evidência de que chutes no nado forçado apresentam uma periodicidade clara dentro da faixa de 4-12 Hz. Considerando que o movimento de apenas uma pata foi registrado, pode-se interpretar que a ritmicidade real dos movimentos seja próxima ao dobro da identificada, porém ainda seria incluída nesta faixa. Além disso, o registro de mais animais será necessário para confirmar ou questionar a frequência rítmica deste comportamento.

### **Relação com oscilações teta**

Comportamentos rítmicos estereotipados são usualmente discutidos como sendo originados em geradores centrais de padrão presentes na medula espinhal e tronco encefálico (LIN et al., 2013; STEUER; GUERTIN, 2018). No entanto, a coincidência entre as frequências dos comportamentos com o ritmo teta (4-12 Hz), predominantemente límbico-cortical, sugere a possibilidade de uma interação mais complexa. Neste sentido, vários estudos têm demonstrado que comportamentos rítmicos como lambidas (AMARANTE; CAETANO; LAUBACH, 2017), movimento da cabeça (LEDBERG; ROBBE, 2011), movimento de vibrissas (GRION et al., 2016), ciclo de passos (JOSHI; SOMOGYI, 2020), pressionamento de barras (BUÑO; VELLUTI, 1977), farejamento em tarefas de discriminação olfativa (KAY, 2005) entre outros, podem modular, sincronizar, acoplar ou serem preditos pelas oscilações teta. Além disso, há evidências de que durante tais comportamentos ocorre a sincronização entre áreas cerebrais relacionadas ao processamento superior destas informações (AMARANTE; LAUBACH, 2021; GRION et al., 2016; KAY, 2005). É proposto que a sincronia de oscilações entre áreas provê janelas temporais que aumentam a eficácia sináptica, facilitando a comunicação entre áreas distantes (FRIES, 2015). Neste sentido, o acoplamento entre comportamentos e oscilações pode resultar em uma periodicidade ótima para aquisição e computação ciclo-a-ciclo no processamento em

rede de informações continuamente apresentadas no ambiente (KEPECS; UCHIDA; MAINEN, 2006). Em paralelo, estudos interessantes sobre ritmos encefálicos acoplados à respiração também demonstram a relevância da relação direcional entre ritmos sensório-motores e oscilações neurais no processamento de informações (TORT; BRANKAČK; DRAGUHN, 2018).

É importante salientar que dada a diversidade de comportamentos acoplados às oscilações teta, esta relação não seja específica a comportamentos sensíveis ou de enfrentamento ao estresse, mas uma propriedade de integração sensório-motora mais geral. No entanto, nossos estudos recentes (artigos I e II) indicando que oscilações teta subjazem o processamento de respostas a adversidades e as evidências apresentadas aqui de que comportamentos inatos indicativos de resiliência têm ritmicidade na mesma frequência incentiva a realização de novos estudos que podem revelar propriedades relevantes da relação entre comportamento, oscilações neurais e resiliência.

### **Conclusão e perspectivas futuras**

Em conjunto, os dispositivos desenvolvidos e os resultados comportamentais preliminares indicam que os sistemas são adequados para investigação da relação entre comportamento e oscilações neurais, embora mais desenvolvimento seja necessário para atingir qualidade suficiente para registro eletrofisiológico durante nado forçado. A ritmicidade dos comportamentos na mesma faixa de frequências das oscilações teta indica uma possível associação e encoraja mais estudos sobre a relação temporal e causal entre esta atividade oscilatória e comportamentos inatos de enfrentamento ou sensíveis ao estresse.

O objetivo original desta padronização seria para investigação de correlatos neurais dos estados comportamentais de enfrentamento ao estresse na atividade oscilatória da rede mesolímbica-hipocampo-cortical por meio de uma abordagem de decodificação neural. Este desenho experimental foi concebido antes da realização do artigo II, porém no andamento do trabalho tivemos várias dificuldades técnicas, que junto à interrupção de serviços terceirizados decorrentes da pandemia de COVID-19, não tivemos a confiança de que seriam sanadas em tempo para finalização da tese, portanto pausamos o projeto. Também nos demos conta de que estes protocolos comportamentais não evocavam uma quantidade suficiente de épocas para um

estudo de decodificação neural por classificação supervisionada. Além disso, preferimos, para um primeiro estudo, usar um desenho experimental baseado em respostas aprendidas, uma vez que os estados comportamentais inatos, apesar de relevantes, não têm significados tão bem delineados em termos de controlabilidade, segurança e valência, sendo alvos de crítica e debate (GURURAJAN et al., 2019). De qualquer modo, foi dada continuidade à exploração da atividade oscilatória de múltiplas regiões durante preferência por sacarose e interação social, a qual está em andamento como parte do doutorado da aluna Tamiris Prizon, enquanto que novos testes para aperfeiçoamento do registro em nado forçado devem ser retomados em breve.

## Referências

- AMARANTE, L. M.; CAETANO, M. S.; LAUBACH, M. Medial Frontal Theta Is Entrained to Rewarded Actions. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 44, p. 10757–10769, 2017.
- AMARANTE, L. M.; LAUBACH, M. Coherent theta activity in the medial and orbital frontal cortices encodes reward value. **eLife**, v. 10, n. e63372, 2021.
- BUÑO, W.; VELLUTI, J. C. Relationships of Hippocampal Theta Cycles with Bar Pressing During Self-Stimulation. **Physiology & Behavior**, v. 19, n. 5, p. 615–621, 1977.
- FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 35–53, 2003.
- FRIES, P. Rhythms for Cognition: Communication through Coherence. **Neuron**, v. 88, n. 1, p. 220–35, 2015.
- GRION, N. et al. Coherence between Rat Sensorimotor System and Hippocampus Is Enhanced during Tactile Discrimination. **PLoS Biology**, v. 14, n. 2, p. e1002384, 2016.
- GURURAJAN, A. et al. The future of rodent models in depression research. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 11, p. 686–701, 2019.
- JOSHI, A.; SOMOGYI, P. Changing phase relationship of the stepping rhythm to neuronal oscillatory theta activity in the septo-hippocampal network of mice. **Brain Structure and Function**, v. 225, n. 2, p. 871–879, 2020.
- KAY, L. M. Theta oscillations and sensorimotor performance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 10, p. 3863–3868, 2005.
- KEPECS, A.; UCHIDA, N.; MAINEN, Z. F. The sniff as a unit of olfactory processing. **Chemical Senses**, v. 31, n. 2, p. 167–79, 2006.
- KRISHNAN, V. et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 391–404, 2007.
- LEDBERG, A.; ROBBE, D. Locomotion-related oscillatory body movements at 6-12 Hz modulate the hippocampal theta rhythm. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27575, 2011.
- LIN, X. BIN et al. The fine temporal structure of the rat licking pattern: What causes the variability in the interlick intervals and how is it affected by the drinking solution? **Chemical Senses**, v. 38, n. 8, p. 685–704, 2013.
- LIU, M. Y. et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia

- in mice. **Nature Protocols**, v. 13, p. 1686–1698, 2018.
- MACRIDES, F.; EICHENBAUM, H. B.; FORBES, W. B. Temporal relationship between sniffing and the limbic  $\theta$  rhythm during odor discrimination reversal learning. **Journal of Neuroscience**, v. 2, n. 12, p. 1705–1717, 1982.
- SHIRVALKAR, P. R.; RAPP, P. R.; SHAPIRO, M. L. Bidirectional changes to hippocampal theta-gamma comodulation predict memory for recent spatial episodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 15, p. 7054–9, 2010.
- SHIRVALKAR, P. R.; SHAPIRO, M. L. Design and construction of a cost effective headstage for simultaneous neural stimulation and recording in the water maze. **Journal of Visualized Experiments**, n. 44, p. 2155, 2010.
- SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature Protocols**, v. 7, n. 6, p. 1009–14, 2012.
- STEUER, I.; GUERTIN, P. A. Central pattern generators in the brainstem and spinal cord: An overview of basic principles, similarities and differences. **Reviews in the Neurosciences**, v. 30, n. 2, p. 107–164, 2018.
- TORT, A. B. L.; BRANKAČK, J.; DRAGUHN, A. Respiration-Entrained Brain Rhythms Are Global but Often Overlooked. **Trends in Neurosciences**, v. 41, n. 4, p. 186–197, 2018.
- TYE, K. M. et al. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. **Nature**, v. 493, n. 7433, p. 537–541, 2013.
- WARDEN, M. R. et al. A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. **Nature**, v. 492, n. 7429, p. 428–432, 2012.
- WHISHAW, I. Q.; VANDERWOLF, C. H. Hippocampal EEG and behavior: change in amplitude and frequency of RSA (theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats. **Behavioral Biology**, v. 8, n. 4, p. 461–484, 1973.
- WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, n. 1, p. 1–16, abr. 1984.
- WILLNER, P.; SCHEEL-KRÜGER, J.; BELZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 10, p. 2331–2371, 2013.