RICARDO PASSONI BINDI

ESTUDO HODOLÓGICO DO NÚCLEO BASOLATERAL ANTERIOR DA AMÍGDALA E DE SUAS FUNÇÕES NOS COMPORTAMENTOS INATOS E CONTEXTUAIS DE DEFESA FRENTE À AMEAÇA PREDATÓRIA.

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

São Paulo
2017

RICARDO PASSONI BINDI

ESTUDO HODOLÓGICO DO NÚCLEO BASOLATERAL ANTERIOR DA AMÍGDALA E DE SUAS FUNÇÕES NOS COMPORTAMENTOS INATOS E CONTEXTUAIS DE DEFESA FRENTE À AMEAÇA PREDATÓRIA.

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

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientador: Prof. Dr. Newton Sabino Canteras

Versão original

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Bindi, Ricardo Passoni
Estudo hodológico do núcleo basolateral anterior da amígdala e de suas funções nos comportamentos inatos e contextuais de defesa frente à ameaça predatória. / Ricardo Passoni Bindi; orientador Newton Sabino Canteras. -- São Paulo, 2017.
50 p.

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

1. Basolateral anterior. 2. Amígdala. 3. Medo inato. 4. Memória. 5. Comportamentos defensivos. I. Sabino Canteras, Newton, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ricardo Passoni Bindi

Título da Dissertação/Tese: Estudo hodológico do núcleo basolateral anterior da amígdala e de suas funções nos comportamentos inatos e contextuais de defesa frente à ameaça predatória.

Orientador: Newton Sabino Canteras

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

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

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

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

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

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

CEUA - ICB/USP
RECEBIDO: 06/05/13
Ass: _____

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

SOLICITAÇÃO PARA INCLUSÃO DE ALUNO EM PROTOCOLO APROVADO - CEUA

Ilmo Sr.
Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
DD. Coordenador da Comissão de Ética no Uso Animais
ICB/USP

Prezado(a) Senhor(a)

Solicito as medidas necessárias à Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB/USP para que seja incluído o aluno "Ricardo Passoni Bindi." ao protocolo de experimentação animal nº085 folha 130 livro 02 /2012 referente ao projeto intitulado "Bases Neurais dos comportamentos motivados" aprovado em 24/08/2012, sob minha responsabilidade.

Declaro que não houve alteração de metodologia experimental nem das técnicas descritas inicialmente quando da aprovação do referido protocolo de experimentação animal. Estamos cientes e de acordo com as regras adotadas pela CEUA. Consultamos os "links" indicados no protocolo e comprometemo-nos a proceder conforme as informações aqui fornecidas. Estamos cientes de que as regras adotadas pela CEUA estão de acordo com a legislação nacional e internacional vigente.

São Paulo, 06/05/2013

Ricardo P. Bindi
Assinatura do aluno:

Newton Sabino Canteras
Prof. Dr Newton Sabino Canteras
Coordenador da Linha de Pesquisa

ICBUSP

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

Of.CEUA.077.16

São Paulo, 22 de agosto de 2016.

Prezado(a) Professor(a),

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

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

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

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

Cordialmente,

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

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

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Newton Sabino Canteras, pela inspiração, qualidade de sua orientação, pelo contínuo incentivo e por todo suporte na realização deste trabalho.

Aos Professores que estiveram presentes durante o exame de qualificação e aos professores presentes na banca examinadora de defesa.

Aos membros do Laboratório de Neuroanatomia Funcional. Particularmente pela colaboração recebida de: Miguel Xavier, Miguel Rangel e Amanda.

Ao meu amigo Fernando e colega de laboratório, pela leitura, correção e aprimoramento do texto deste trabalho.

Ao meu primo, amigo e colega do curso CM, Ivã, por ter me ajudado a escolher minha graduação e auxiliado diversas vezes durante o curso, em especial com seu conhecimento em matemática.

A minha namorada, Paula, por ajudar na correção deste trabalho, me manter concentrado e calmo durante a execução deste trabalho, bem como por todo suporte emocional.

Ao meu pai, Carlos, por me criar como pensador e homem com valores éticos e morais. Um homem que sempre tive como exemplo a seguir. Além de ter me auxiliado de forma direta na correção deste trabalho.

A minha mãe, Vanda, por sua ajuda na minha formação como pessoa. Pela excelente mulher que ela é por todo apoio que ela deu.

A minha família.

Processo nº 2015/00620-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

BINDI, R. P. **Estudo hodológico do núcleo basolateral anterior da amígdala e de suas funções nos comportamentos inatos e contextuais de defesa frente à ameaça predatória.** 2017. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O núcleo basolateral anterior da amígdala (BLAa) tem sido extensivamente investigado em estudos de condicionamento pavloviano envolvendo estímulos aversivos físicos. Até o presente momento não há descrição funcional específica do BLAa frente aos estímulos etologicamente relevantes. Neste trabalho, inicialmente revisitamos as conexões aferentes e eferentes do BLAa. Nossos achados confirmam em grande medida relatos anteriores da literatura e mostram que o núcleo integra informações de sistemas relacionados ao alerta emocional (tais como o locus coeruleus, dorsal da rafe e substância inominada). Este também se relaciona intimamente a estruturas ligadas à circuitaria do córtex pré-frontal, como o núcleo acúmbens, o caudo-putamen dorsomedial além dos córtices pré-límbico e cingulado anterior. Além disso estabelece conexões bidirecionais importantes com o córtex insular e com a região para-hipocampal. Testamos ainda o papel específico do BLAa frente à ameaça predatória e vimos que este influencia respostas de medo inato e contextual à ameaça predatória. Primeiramente, sugerimos que o BLAa responde ao estímulo do predador pelos sistemas de controle de alerta emocional, dado que ele recebe aferências de estruturas responsivas à presença do predador, como o *locus coeruleus*, que estão ligadas ao controle do alerta. Sugerimos também que através de suas projeções para o núcleo acúmbens, a região estudada, possa influenciar as respostas de defesa inata. Ademais as respostas de medo aprendido, ao contexto em que o rato foi exposto ao predador, podem ser afetadas por meio das relações do BLAa com os córtices pré-limbico, cingulado anterior e com a região para-hipocampal.

Palavras-chave: Basolateral anterior. Amígdala. Medo inato. Memória. Comportamentos defensivos.

ABSTRACT

BINDI, R. P. **Hodological study of the anterior basolateral amygdaloid nucleus and its behavioural roles in innate and contextual fear towards a predatory threat.** 2017. 50 p. Master thesis (Morphofunctional Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The anterior basolateral nucleus of the amygdala (BLAa) has been extensively investigated in studies of Pavlovian conditioning involving physical aversive stimuli. To date, there is no specific functional study of the BLAa regarding its functional roles on responses to ethologically relevant threats. In this work, we initially revisited the afferent and efferent connections of the BLAa. Our findings largely confirm previous reports in the literature, and show that the nucleus integrates information from systems related to emotional alertness (such as the *locus coeruleus*, dorsal raphe and innominate substance), and is also closely related to the prefrontal cortex circuitry, including the nucleus accumbens, the dorsomedial caudoputamen, and the prelimbic and anterior cingulate cortices. It also establishes important bi-directional connections with the insular cortex and parahippocampal region. We also tested the specific role of BLAa in innate and contextual responses to predatory threat. Thus, we have seen that BLAa influences innate and contextual fear responses to predatory menace. Firstly, we suggest that the BLAa responds to the predator's stimulus by the emotional arousal systems, given that it receives inputs from alert related structures highly responsive to the predator threat, such as the *locus coeruleus*. We also suggest that through its projections to the nucleus accumbens, the BLAa may influence innate defensive responses. In addition, we suggested that the BLAa influences contextual fear responses mostly through its relationships with the prelimbic, anterior cingulate and parahippocampal cortices.

Keywords: Anterior basolateral. Amygdala. Innate fear. Memory. Defensive behaviours.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

2 OBJETIVOS 15

3 HIPÓTESES 16

4 MATERIAIS E MÉTODOS 17

4.1 Animais 17

4.2 Cirurgia de lesão química 17

4.3 Desenho experimental 18

4.4 Perfusão e histologia 19

4.5 Injeção iontoforética dos traçadores 19

4.6 Detecção imunoistoquímica do FG e histoquímica de BDA. 20

4.7 Análise do material histológico 20

4.8 Análise comportamental 21

4.8.1 Padrões comportamentais a serem analisados (etograma): 21

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 23

6 RESULTADOS 24

6.1 Resultados das projeções 24

6.1.1 Conexões eferentes do BLAa 24

6.1.1.1 Projeções corticais 24

6.1.1.2 Projeções estriatias 24

6.1.1.3 Projeções amigdalares 25

6.1.2 Conexões aferentes ao BLAa 28

6.2 Resultados comportamentais 31

6.2.1 Resultados da habituação ao ambiente experimental 31

6.2.2 Resultados da exposição ao predador (gato) 32

6.2.3 Resultados no contexto em que ocorrera a exposição ao predador 32

7 DISCUSSÃO DA PROJEÇÕES 36

7.1 Aferências 36

7.2 Eferências 37

8 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS COMPORTAMENTAIS 39

9 CONCLUSÃO 44

10 REFERÊNCIAS 45

1 INTRODUÇÃO

O termo medo é usado para descrever uma sensação que emerge de uma experiência que ameaça a sobrevivência ou é gerada por uma sensação de perigo inespecífica. De Darwin a pesquisadores atuais, (para revisão ver MARKS; NESSE, 1994), o medo é visto como uma resposta fundamental para a adaptação da espécie ao meio. Ecologistas comportamentais estudaram a significância de comportamentos de defesa ligado ao medo, entre outros, em suas hipóteses evolutivas, mostrando o papel fundamental dos comportamentos de defesa para adaptabilidade da espécie (para revisão ver KREBS; DAVIES, 1996). Como a resposta de medo tem um efeito central na adaptação do indivíduo, as bases neurais para os comportamentos motivados de medo devem ser compartilhadas evolutivamente entre as espécies. Tal situação foi tratada em estudos mostrando circuitos neurais em comum entre animais, incluindo humanos (LEDOUX 2012). Nesta revisão, o autor descreve o conceito de "circuito de sobrevivência" que integraria ideais sobre motivação, emoção, reforço, e alerta, para entender como organismos sobrevivem e prosperam frente a um ambiente complexo. Como exemplo, espécies de répteis e aves apresentam uma circuitaria amigdalar homóloga à observada em vários mamíferos, como roedores, coelhos, primatas não humanos e humanos (para revisão ver, LEDOUX, 2012). Assim, estudar o medo em ratos não nos limita a melhorar o entendimento do comportamento destes animais. Melhorar a compreensão das bases neurais dos circuitos de medo nos dá ferramentas para clarificar um sistema amplamente conservado entre espécies.

Em humanos desvios nas respostas adaptativas relativas ao medo, podem levar a transtornos de hipofobia (muito pouco medo) passando por transtornos leves de ansiedades até condições incapacitantes manifestas em distúrbios de ansiedade, generalizadas, fobias específicas (MARKS; NESS, 1994). Por exemplo, em indivíduos com fobia social, até a apresentação de faces neutras provocam uma maior atividade tanto da amígdala e do córtex orbito frontal, quando comparado com indivíduos do grupo controle (VEIT et al., 2002).A memória aversiva também tem valor adaptativo. Ao lembrar do medo, quando foi exposto ao perigo, o indivíduo tem a oportunidade de minimizar riscos futuros. O valor adaptativo da memória envolve sistemas mnemônicos que evoluíram para maximizar a sobrevivência e ajudar a reter a informação relacionadas a adaptabilidade (fitness). Este valor melhora a retenção de memória quando, por exemplo, a informação tem qualidades emocionais, alimentares ou sexuais (NAIRNE et al. 2007).

Seguindo neurocientistas comportamentais usamos os termos "medo" e "resposta de medo" para nos referirmos às respostas psicológicas e comportamentais evocadas pelos

animais quando expostos às ameaças potenciais ou eminentes. Isso não pressupõe equivalência de sentimentos entre humanos e roedores (LEDOUX, 2012). Tampouco tal *a priori* é necessário. São amplas as implicações funcionais da amígdala e da circuitaria da qual ela participa tanto em humanos quanto em roedores. Serão discutidas implicações funcionais no modelo animal.

A amígdala é uma estrutura heterogênea com parte cortical, estriatal e com conexões e funções muito distintas (SWANSON; PETROVICH, 1998), por isso é necessário diferenciá-la de forma adequada. Em diversos trabalhos encontrados na literatura, o núcleo lateral (LA) e o basolateral (BLA) são tratados em conjunto como se fossem parte da mesma estrutura e referidos como sendo o complexo basolateral da amígdala, que inclui LA, basomedial (porção anterior e posterior) e BLA (porção anterior e posterior). Diversos estudos, utilizando condicionamento pavloviano clássico com estímulos aversivos, mostraram que o aprendizado associativo entre o estimulo condicionado (CS) e o estímulo incondicionado (US) ocorre no complexo basolateral da amígdala, de tal forma que tanto lesões quanto inativações farmacológicas neste local previnem a aquisição e expressão do condicionamento de medo (FANSELOW; LEDOUX, 1999; LEDOUX, 2000; MCGAUCH, 2004; MAREN, 2001; PHILLIPS; LEDOUX, 1992). Todavia, estudos usando lesões mais seletivas mostraram que as lesões do LA e do BLA, mas não do núcleo basomedial, interferem tanto na aquisição como na expressão da resposta de medo condicionada a um estímulo doloroso (GOOSENS; MAREN 2001).

A ideia corrente e bastante aceita na literatura é que o núcleo central da amígdala (CeA) está implicado na expressão do medo condicionado a estímulos dolorosos. O que ocorre através de projeções que o complexo basolateral como um todo tem para esse núcleo, que por sua vez conecta-se com estruturas localizadas no tronco encefálico (KAPP et al., 1979; PHILLIPS; LEDOUX, 1992). Todavia, lesões do CeA não afetam as respostas de medo incondicionadas ao predador (MARTINEZ et al., 2011) e nem ao seu cheiro (LI et al., 2004), tampouco afetam a memória de medo condicionado a um ambiente previamente pareado ao predador (MARTINEZ et al., 2011). Por outro lado, o complexo basolateral tem um papel relevante nas respostas de defesa antipredatória. Estudos mostraram que lesões do complexo basolateral não apenas interferem nas respostas de defesa incondicionadas ao odor de gato (LI et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2007; VAZDARJANOVA et al., 2001), como também na consolidação da memória de medo condicionado a um ambiente previamente pareado ao odor de gato (TAKAHASHI et al., 2007).

Um estudo prévio de nosso laboratório mostrou que as lesões do LA e basomedial posterior - principal alvo amigdaliano do LA (KRETTEK; PRICE,1978) - afetam as respostas incondicionadas ao predador e abolem as respostas contextuais ligadas a pistas predatórias (MARTINEZ et al., 2011). Se destaca que o núcleo basomedial posterior se projeta densamente à parte dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo (PETROVICH et al., 1996), região integrante do sistema hipotalâmico de defesa da zona medial, envolvido tanto na expressão das respostas inatas como contextuais à ameaça predatória (GROSS; CANTERAS, 2012).

Ainda não foi estabelecido o envolvimento do BLAa nas respostas de defesa inata e contextual à ameaça predatória. Porém, já se sabe, por meio de experimentos que avaliaram a expressão da proteína FOS em cortes histológicos sob diferentes condições experimentais, que o BLAa apresentou um aumento de atividade frente à ameaça predatória. Este incremento ocorre em menor grau quando comparado à outras estruturas amigdalares, tais como o LA, basomedial posterior (BMAp) e a parte póstero ventral do núcleo medial da amígdala (MEApv) (MARTINEZ et al., 2011). Tanto o LA, quanto o BMAp, recebem projeções extremamente densas do córtex perirhinal e ectorhinal (KRETTEK; PRICE, 1978). Embora os núcleos LA e BLAa sejam comumente tratados como parte do mesmo complexo, estes núcleos possuem diferenças críticas nos padrões de suas conexões. Sabe-se, por exemplo, que o LA e o BMAp estão intimamente ligados entre si. Por outro, lado o BLAa não possui ligação com o BMAp (KRETTEK; PRICE, 1978). Ainda entre essas diferenças, é conhecido que o BMAp se projeta densamente para parte dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo (PETROVICH et al., 1996), região integrante do sistema hipotalâmico de defesa (GROSS; CANTERAS, 2012).

Apesar do BLAa não ser constituinte do circuito de sistema de defesa, os córtices pré-limbico (VERTES, 2004), cingulado anterior (OTTERSEN, 1982) e agranular insular anterior e posterior (REEP; WINANS, 1982b; OTTERSEN, 1982) se projetam para o BLAa e recebem projeções do mesmo (KRETTEK e PRICE, 1977; REEP; WINANS, 1982a). Desta forma este núcleo estabelece densas projeções bidirecionais com as áreas pré-frontais e agranular insular. Experimentos com lesões mostraram que tanto o córtex pré-limbico quanto o cingulado anterior são fundamentais para o processo de aquisição da memória de medo (DE LIMA, 2015). O BLAa também projeções recíprocas com o núcleo do trato olfatório lateral (NLOT), estrutura que carrega informação olfativa não ferormonal do ambiente (SANTIAGO; SHAMMAH-LAGNADO, 2004; SAVANDER et al., 1995).

Ainda foi constado que o BLAa se projeta densamente para o tubérculo olfatório e para o núcleo acúmbens (MCDONALD, 1991b). Ademais, é interessante notar que o BLAa recebe substanciais projeções colinérgicas (da substância inominata) (OTTERSEN, 1980), noradrenérgicas (do *locus coeruleus*) (JONES; YANG, 1985) e serotonérgicas (do núcleo dorsal da rafe) (VERTES, 1991). Sabe-se que as modulações providas por estes neurotransmissores no complexo amigdaloide influenciam processos relacionados ao medo (INOUE et al., 1993; KAWAHARA et al., 1993; MCGAUGH, 2004). Além disso o BLAa estabelece conexões bidirecionais com o córtex ectorhinal e perirrinal (KRETTEK e PRICE, 1977; PITKÄNEN et al., 2000). Todavia, estes achados são apresentados em diferentes estudos e de forma muito fracionada, desta forma o primeiro objetivo deste estudo é revisitar as conexões aferentes e eferentes do BLA.

O BLAa tem sido extensivamente investigado em estudos de condicionamento pavloviano envolvendo estímulos aversivos. Todavia, conforme mencionamos anteriormente, ainda não foi investigado o seu papel específico nas respostas inatas e contextuais ligadas a estímulos etologicamente relevantes, como a interação predatória. Logo, como segundo objetivo deste trabalho foi investigado o seu papel durante a interação predatória, tanto na resposta inata como contextual.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho visou estudar as bases neurais dos comportamentos de defesa na exposição ao predador e ao contexto, para tanto, estabelecemos dois objetivos:

a) Investigação hodológica do BLAa. Com objetivo de descrever de forma sistemática a circuitaria tanto de aferências quanto de eferências do núcleo.

b) Análise do papel do BLAa nas respostas de medo inatas e contextuais à ameaça predatória.

3 HIPÓTESES

Foi investigada a hipótese de que o BLAa esteja envolvido em uma circuitaria ainda não descrita para o medo predatório e para os processos mnemônicos deste medo, uma vez que suas conexões são distintas do resto do complexo basolateral.

O presente trabalho investigou ainda a hipótese de que o BLAa esteja envolvido no medo inato e aprendido frente à um predador.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 41 ratos Wistar, dos quais 20 fizeram parte dos grupos estudados (4 para estudos das projeções e 16 para o estudo comportamental), provenientes do Departamento de Anatomia do ICB-USP, com 3 meses de idade e aproximadamente 300 g, mantidos em condições estáveis de temperatura (aproximadamente 23 °C) e ciclo claro/escuro controlados (12 horas), com livre acesso à água e ração, exceto durante 10 minutos de gravação ou habituação. Todos mantidos no biotério de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foram tomadas as medidas necessárias para utilizar o menor número possível de animais e também para evitar seu sofrimento.

4.2 Cirurgia de lesão química

Os animais foram anestesiados por uma injeção intraperitonial de Equitesin (0,3 ml/100 g) e em seguida posicionados no estereotáxico. Quando o osso se tornou visível uma janela foi aberta expondo o polo frontal.

O polo frontal foi usado como ponto de referência anatômica para as coordenadas antero-posterior e a sutura sagital foi usada como referência para as medidas latero-medial. A dura máter teve papel de referência dorso-ventral. A partir destes marcos anatômicos, foram retiradas as coordenadas do atlas (SWANSON, 2004) que levam ao núcleo BLAa e o endopiriforme. Alguns animais foram necessários para ajustar as coordenadas devido a variabilidade do tamanho dos ratos em relação ao padrão do atlas.

Depósitos iontoforéticos bilaterais de uma solução de 0,15 M de N-methyl-D-aspartate (NMDA, Sigma, St. Louis, MO, USA) foram feitos no BLAa e no EP, ademais, para controlar o efeito da lesão, foram feitos animais com lesões fora das regiões de interesse nos animais controle .Os depósitos de NMDA feitos com injeções durando cerca de 8 minutos através de uma micropipeta (40 μm de diâmetro), usando um dispositivo de corrente contínua (modelo CS3, Midgard Electronics, Canton, MA) para produzir uma corrente de - 8 μA, com 7 segundos de duração entre o pulso e interpulso. Depois de uma semana da cirurgia, os animais foram colocados no aparato experimental. Os locais e as extensões das lesões foram verificadas por meio de cortes histológicos corados pela coloração de Nissl.

4.3 Desenho experimental

O presente estudo foi realizado com base em um modelo etológico comportamental, expondo o rato ao seu predador natural (um gato). Para tanto, após a cirurgia, cada rato permaneceu individualmente em uma caixa com dimensões de lado 25 x 25 x 25 cm (caixa moradia), com uma porta com acesso a um corredor de 1 metro de comprimento que leva a outra caixa (compartimento alimentar), com as mesmas dimensões, onde será colocada a comida. O aparato experimental é constituído de acrílico transparente e está representado na figura 1.

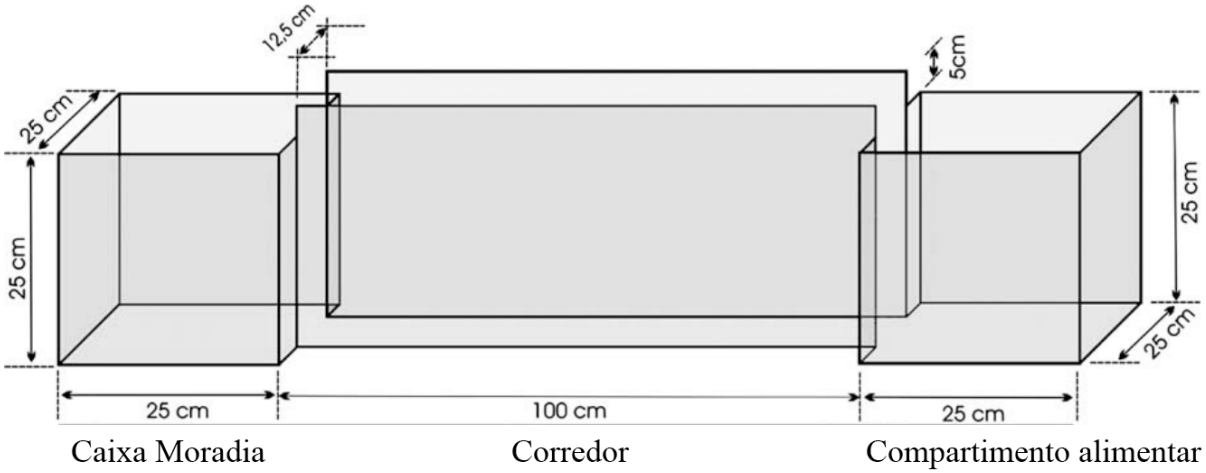

FIGURA 1 - Representação do aparato experimental no qual o rato foi ambientado.

Durante 10 dias, os animais passaram por um período de adaptação a este aparato, na caixa moradia com alimento e bebida. Três horas antes do período de troca entre o claro e escuro a comida foi retirada da caixa moradia do roedor. No início do período de escuro, durante o primeiro pico de atividade do animal, a porta foi aberta permitindo que os animais explorassem o corredor e se deslocassem até o compartimento de comida, para obterem a ração ali depositada. Durante o décimo dia do período de habitação, os comportamentos dos animais foram gravados durante os primeiros dez minutos após abertura da caixa moradia, a fim de observarmos o padrão comportamental no animal bem familiarizado ao ambiente.

Até o décimo dia de habituação ao ambiente, a retirada do alimento foi feita três horas antes da abertura da porta. Todo o procedimento descrito permitiu que os animais permanecessem ativamente buscando alimento.

No décimo primeiro dia, após a adaptação, no momento em que a porta da caixa moradia fosse aberta, o experimentador introduziu um gato macho no compartimento de comida. Lá ele foi mantido durante o procedimento. A exposição ao gato durou 10 minutos e,

durante esta exposição, os padrões comportamentais do rato foram quantificados mediante a análise dos vídeos.

Após essa exposição, o gato foi removido, sendo tanto o compartimento de comida, quanto o corredor, limpos com álcool 70% e secos com papel toalha, para remoção das pistas do predador.

No dia seguinte após a exposição ao gato, foram gravados os comportamentos do rato no ambiente onde o predador havia permanecido anteriormente (contexto predatório), durante 10 minutos. Os animais ficaram na caixa moradia e foram expostos ao contexto predatório somente depois da abertura da porta que dá acesso ao corredor e ao compartimento de comida, lugar em que o predador foi anteriormente encontrado.

4.4 Perfusão e histologia

Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com sódio pentobarbital na dosagem de (40mg/kg, i.p.) para a perfusão transcardíaca com uma solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M com pH de 7,4, precedida por solução salina 0,9%. Após a perfusão, os encéfalos foram retirados do crânio e colocados em solução de sacarose 20% feita em tampão fosfato 0,1 M na temperatura de 4 ºC por um período de aproximadamente 12 horas. Posteriormente, os encéfalos foram congelados e cortados no plano frontal em micrótomo de congelação, com espessura de corte de 40 μm. Os cortes foram recolhidos em 5 séries. Uma série montada previamente em lâminas gelatinizadas e corada pela Técnica de Nissl, serviu de referência citoarquitetônica.

A fim de identificar o sítio da lesão por NMDA, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e posteriormente coradas pela Técnica de Nissl. O tamanho da lesão foi estimado pela comparação com animais de referência não lesionados. As medidas foram realizadas por meio do software computacional Image Pro-Plus versão 4.5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

4.5 Injeção iontoforética dos traçadores

Os animais são anestesiados por via intraperitoneal com uma solução de Equitesin (0,3 ml/100 g) e em seguida posicionados em aparelho estereotáxico, onde recebem um depósito iontoforético unilateral de amina dextrana biotilinada (BDA) a 10% ou depósito iontoforético unilateral de hidroxistilbamidina, nome comercial Fluorogold (FG) a 2% ambos no núcleo basolateral anterior. Os depósitos são feitos através de micropipetas de vidro com

diâmetro interno de ponta da ordem de 20 µm, mediante aplicação de +5 µA de corrente pulsátil (7seg “on”, 7 seg “off”) durante 5 minutos, provida de uma fonte de corrente constante (Midgard Eletronics, Modelo CS3). Após o período de injeção, as micropipetas são deixadas no local por 10 minutos para evitar o escoamento do traçador ao longo do trajeto da pipeta.

4.6 Detecção imunoistoquímica do FG e histoquímica de BDA.

Os cortes são inicialmente incubados durante 48 horas em uma solução de KPBS 0,02 M contendo Triton X-100 0,3% e soro normal de cabra a 2%, usando-se um anticorpo primário anti-FG obtido em coelho (Ab-153/Chemical International) numa diluição de 1:5000. Estes são mantidos sob agitação constante a 4 ºC durante 48 h. Esta parte é feita apenas para detecção imunoistoquímica do FG.

A partir desta parte começa o processo histoquímico, que é compartilhado pela detecção histoquímica de BDA. O complexo antígeno-anticorpo é visualizado usando-se a técnica de imunoperoxidase com o complexo biotina-avidina (ABC Elite Kit, Vector Laboratories) numa diluição 1:200, KPBS 0,02 M e Triton X-100 0,3%; para ligar a peroxidase ao complexo antígeno-anticorpo. Na reação de imunoperoxidase, para a revelação do complexo antígeno-anticorpo, é utilizado o protocolo de Itoh e cols. (1979). Resumidamente, os cortes são incubados em uma solução de 100ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo 50 mg de tetrahidrocloreto de 3-3’ diaminobenzidina (DAB) (Sigma), 0,6 mg de glicose oxidase e 40 mg de cloreto de amônia, por 5 minutos. Em seguida, adiciona-se a β-D-glicose (Sigma), e a reação é interrompida após um período de aproximadamente 15 minutos.

Após a reação imuno-histoquímica, os cortes são montados em lâminas recobertas com gelatina. Em seguida, os cortes serão desidratados e recobertos com DPX (Aldrich Chemical Co.). Cortes adjacentes serão corados pelo método de Nissl, com tionina 0,25% como corante, para servir como referência citoarquitetônica.

4.7 Análise do material histológico

O mapeamento das fibras marcadas anterogradamente, bem como o local de injeção do traçador, são plotados com auxílio de uma câmera lúcida acoplada a um microscópio Nikon E600, a partir de desenhos de cortes adjacentes corados com a técnica de Nissl, e em

seguida serão transpostos para representações esquemáticas do encéfalo do rato extraídas do atlas "Brain Maps: Structure of de Rat Brain" (SWANSON, 2004).

Com o uso do programa Image-Pro Plus a porcentagem do núcleo lesado foi aferida nos encéfalos dos ratos com lesões no núcleo basolateral anterior nos níveis 24 ao 29 do atlas (SWANSON, 2004). Com base no atlas foi feito um delineamento do BLAa em um animal integro em todos os níveis que ele aparece (24 ao 29) e com o programa Image-Pro Plus foi feita a medição da área total do núcleo em todos estes níveis. As mensurações das áreas das regiões integras nos animais lesados foram feitas delimitando apenas a área integra restante do BLAa em cada uma das coordenadas anteroposterior corresponde aos níveis. Para calcular a porcentagem de lesão foram dividas as áreas integras restantes total pela área integra total de um animal integro.

4.8 Análise comportamental

Os testes comportamentais foram realizados nos seguintes dias: no 10º dia do período de adaptação ao ambiente; no 11º dia - exposição ao gato; e no 12º dia - exposição ao contexto predatório. Para cada um destes dias, tivemos 10 minutos de observação que foram gravados em uma câmera de vídeo montada horizontalmente, sob iluminação de luz vermelha de 50W.

Os vídeos foram analisados posteriormente por um observador treinado com auxílio de um software, The Observer (Noldus), de análise etológica. Todos os testes foram feitos no início do período escuro. Foram avaliados os parâmetros espaço temporais e comportamentais. As medições espaço-temporais estão relacionadas com o tempo gasto pelo animal na caixa moradia, corredor ou no compartimento de comida. As medições comportamentais foram categorizadas em seis comportamentos. Porém durante a análise elas foram agrupadas em comportamentos de exploração (Locomoção, *"Up-right position"*), avaliação de risco (*"Streatch Attend", "Streatch Approach", e "crouch sniff")* e congelamento.

4.8.1 Padrões comportamentais a serem analisados (etograma):

- **Congelamento**: Estado em que o animal cessa todos os movimentos, exceto aqueles relacionados com a respiração.
- *"**Crouch sniff**"*: O animal fica estático e com o dorso arqueado, mas ativamente movimentando as vibrissas e a cabeça para cheirar, tatear e olhar o ambiente

- *"**Stretch Attend Posture"***: Parado o animal permanece com o corpo esticado, com a cabeça apontada para frente e com a cauda levantada
- *"**Stretch Approach"***: Move-se lentamente para o compartimento de comida com o corpo esticado e a cabeça estendida para frente.
- **Locomoção**: Movimentação translacional do corpo de mais de 1 cm sem que o corpo fique estendido.
- *"**Up-right position"***: O animal ativamente explora o ambiente apoiando seu peso sobre as patas traseiras e se apoiando nas paredes com as patas dianteiras.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para manter a chance de erro tipo I abaixo de 5% foi feita uma correção de múltiplas comparações de Dunn–Šidák sempre que observada mais de uma ocorrência da hipótese nula na primeira análise entre os grupos com o teste de Mann Whitney U. A correção de Dunn–Šidák para 6 classes de comportamentos (exploração, avaliação de risco e congelamento motor e o tempo gasto em cada um dos três compartimentos) com um alfa de 5% resulta em um alfa corrigido de 0,85%. Realizando inspeções para verificar quebra de normalidade nos dados comportamentais com teste Shapiro-Wilk e inspeção visual no gráfico normal Q-Q encontrou-se que a maior parte das variáveis dependentes possuem uma distribuição não normal. Como há quebra de normalidade foram feitos testes não paramétricos.

Para testar a homogeneidade da variância foi feito o teste de Levene não paramétrico. Uma heterocedasticidade poderia levar à falha na interpretação dos testes subsequentes. Por isso não foi feita correção para comparações múltiplas, pois cometer um erro tipo I é ser cauteloso ao não deixar de reportar uma possível falha de homogeneidade da variância.

6 RESULTADOS

6.1 Resultados das projeções

6.1.1 Conexões eferentes do BLAa

Em duas injeções obtivemos os depósitos de BDA inteiramente confinados ao BLAa. O padrão de projeção foi bastante semelhante nesses dois casos. Escolhemos o experimento 45, representado na Figura 2, para ilustrar os o padrão de marcação anterógrada.

Como se vê na Figura 2, o BLAa apresenta um padrão relativamente restrito de projeções para o córtex cerebral, amígdala e estriado.

6.1.1.1 Projeções corticais

O BLAa projeta-se densamente para os córtices pré-límbico (PL), cingulado anterior dorsal (ACAd) e motor suplementar (Mos). Como ilustrado na Figura 4A, estas projeções formam campos terminais relativamente densos na camada 2 e também nas camadas 5 e 6a. Projeções densas foram encontradas também nos córtices agranular insular ventral (AIv) e dorsal (AId), particularmente nas camadas 5 e 6, que se estendem para o claustrum adjacente (Fig. 2A, B). No córtex insular, fibras marcadas anterogradamente continuam caudalmente, e provém um campo terminal esparso nas camadas profundas do córtex agranular insular posterior e claustrum adjacente (Fig. 2C). A níveis mais caudais, observamos uma projeção densa para o córtex visceral (VISC), principalmente nas camadas 5 e 6, e regiões claustrais adjacentes (Fig. 2E, F). Parte destas fibras continuam e se projetam esparsamente para camadas profundas do córtex perirrinal.

6.1.1.2 Projeções estriatias

Projeções extremamente densas para diversos setores estriatais foram observadas. Assim, campos terminais extremamente densos foram encontrados no tubérculo olfatório (OT), núcleo acúmbens (ACB) e caudo-putamen (CP). No tubérculo olfatório notamos um denso campo terminal principalmente na camada 2, que se estende em menor grau para a camada 3 (Fig. 2B). Campo de projeção extremamente denso foi encontrado no núcleo acúmbens, que nos dois casos com injeção de BDA restrita ao ACB estava distribuído principalmente nas regiões laterais do núcleo (Fig. 2B). No caudo-putamen, campo terminal muito denso foi encontrado nos setor dorsomedial (Fig. 2C, D).

6.1.1.3 Projeções amigdalares

O BLAa tem projeções relativamente restritas na amígdala. A níveis rostrais, notamos campo terminal, denso e circunscrito no núcleo do trato do trato olfatório lateral (NLOT; Fig 2D), distribuído nas camadas 2 e 3. Notamos também projeção moderada para a região capsular do núcleo central (Fig. 2 E) e, mais caudalmente, projeção densa para a parte posterior do núcleo basolateral (BLAp; Fig. 2F). Nestes níveis verificamos ainda um pequeno número de fibras que se projetam para o LA.

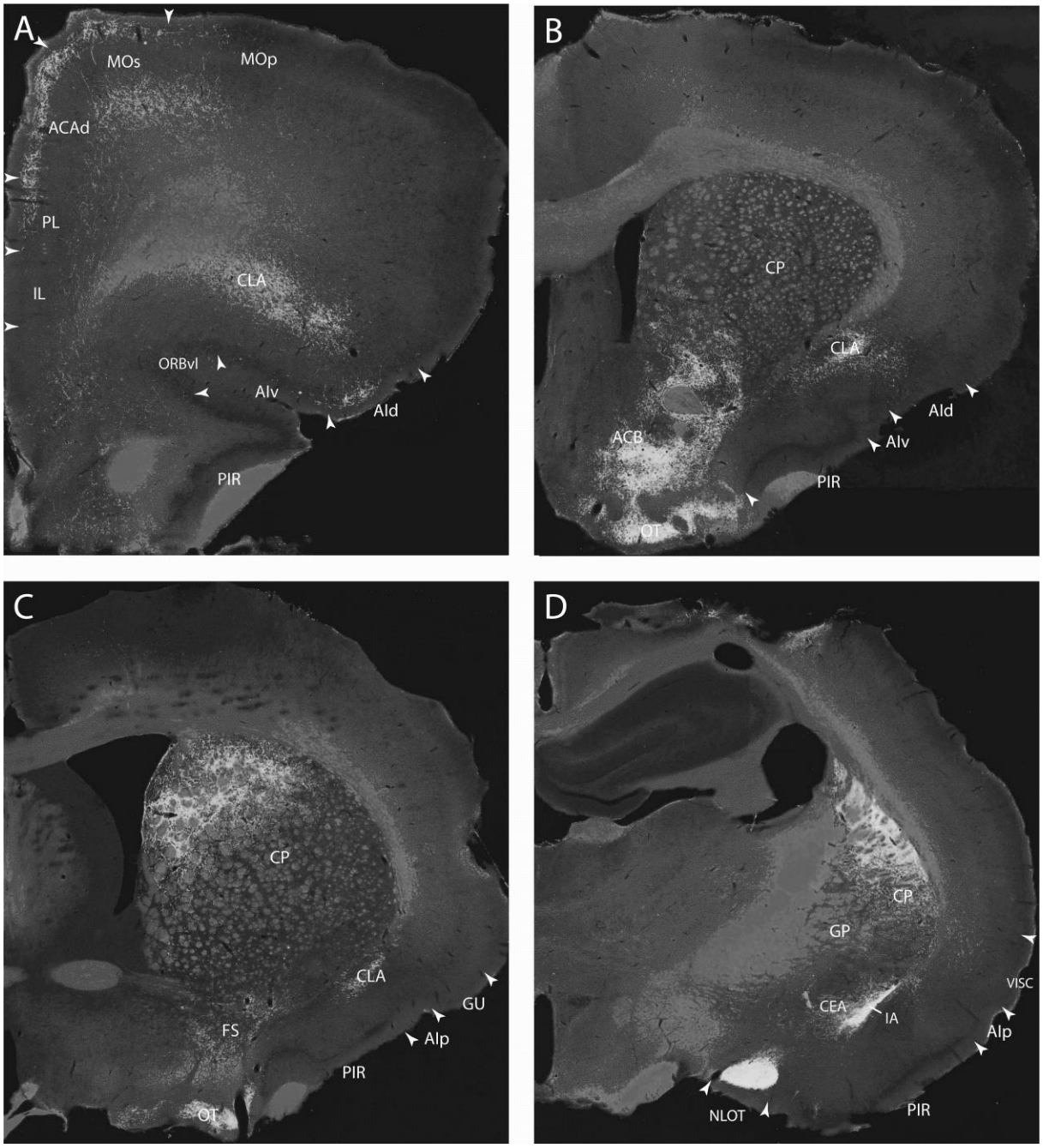

FIGURA 2 - (A - D) Microfotografia de campo escuro de secção transversal, após a injeção de BDA no BLAa, mostrando as projeções de eferências.

Abreviações: ACAd, área anterior cingulada parte dorsal; ACB, núcleo accumbens; AId,-p e -v, área agranular insular, parte dorsal, posterior e ventral; CEA, núcleo central da amígdala; CLA, claustro; CP, caudado putamem; FS, fundo estriatal; GU, área gustatória; IA, núcleo intercalado da amígdala; IL, área infra límbica; MOs,-p, área somatomotora secundária, primária; NLOT, núcleo do trato olfatório lateral; ORBvl, área orbital parte ventrolateral; OT, tubérculo olfatório; PIR, área piriforme; PL, área prelímbica; VISC, área visceral.

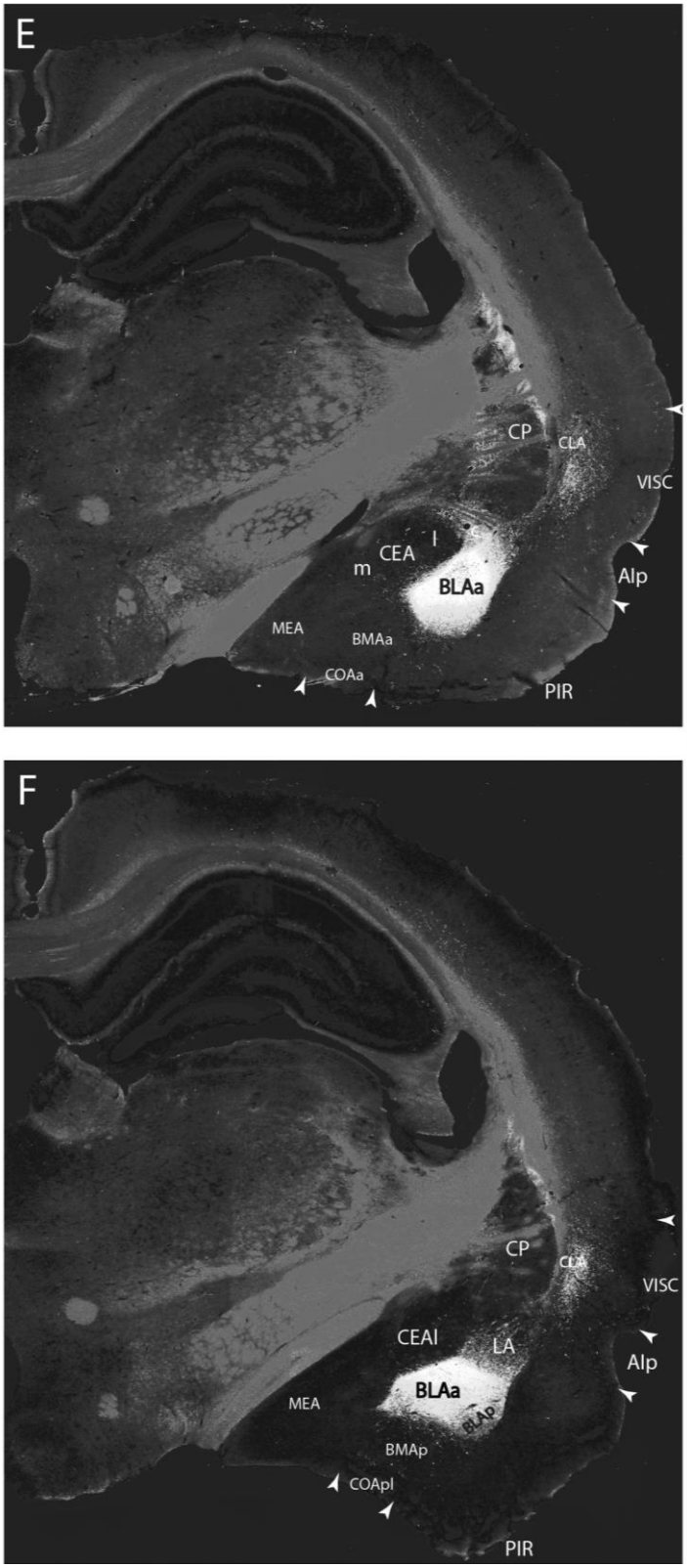

FIGURA 2 - (E, F).
Abreviações: AIp, área agranular insular, parte ventral; BLAa e -p, núcleo amigdalar basolateral parte anterior e posterior; BMAa e -p, núcleo amigdalar anterior e posterior; CEAc, -l e -m, núcleo central da amígdala parte corpuscular, lateral e medial; CLA, claustro; COAa, -pl, núcleo amigdalar cortical parte anterior, posterior, zona lateral; CP, caudado putamem; MEA, núcleo medial amigdalar; LA, núcleo lateral amigdalar; PIR, área piriforme; VISC, área visceral.

6.1.2 Conexões aferentes ao BLAa

Em duas injeções o traçador retrógrado (Fluoro-Gold) estava confinado ao BLAa. Em ambos os casos, o padrão de marcação retrógrada foi similar, sendo que escolhemos o experimento 32 para ilustrar o padrão de distribuição das células retrogradamente marcadas (Figura 3).

Células retrogradamente marcadas foram encontradas em diversas regiões corticais, na amígdala, no prosencéfalo basal, no tálamo e no tronco encefálico.

Nos córtices pré-limbico (PL), cingulado anterior dorsal (ACAd) e motor suplementar (Mos) encontramos um número moderado de células retrogradamente marcadas distribuídas pelas camadas 3 a 6a (Fig. 3A). Um maior agregado de marcação retrógrada estava distribuído pelas camadas 2 a 5 do córtex agranular insular dorsal (Aid; Fig. 3B). Mais caudalmente na região insular, moderado número de células retrogradamente marcadas foram encontradas nos córtices agranular insular posterior (AIp) e visceral (VISC). A níveis caudais, um número particularmente grande de células marcadas foi encontrada nas camadas profundas do córtex perirrinal (PERI) e nas camadas 2 e 3 do córtex entorrinal lateral (ENTl) (Fig. 3G), que em conjunto com o AId devem representar as principais fontes de aferências corticais ao BLAa.

Na amígdala, destacamos fontes de projeção particularmente densa do núcleo do trato olfatório lateral (NLOT) e da parte posterior do núcleo basolateral (BLAp). No NLOT notamos células retrogradamente marcadas na camada 3 (Fig. 3 D), onde destacamos também expressiva marcação retrógrada contralateral. No BLAp destacamos um denso agregado de marcação retrógrada (Fig. 3G). Notamos ainda na amígdala, um número relativamente pequeno de células marcadas na parte ventral do núcleo medial da amígdala (Fig. 5E). Imediatamente adjacente à amígdala, notamos um número conspícuo de células marcadas na borda medial do córtex piriforme (PIR).

Na substância inominata (SI) encontramos um grande agregado celular retrogradamente marcado (Fig 3C, D), que apresenta neurônios grandes, com boa arborização dendrítica, compatível com a população de células colinérgicas do prosencéfalo basal. No tálamo, agrupamentos de células retrogradamente marcadas nos núcleos central medial (Fig. 3F) e paraventricular posterior.

Finalmente, no tronco encefálico um moderado número de neurônios retrogradamente marcados foi encontrado nos núcleos dorsal da rafe (Fig. 3H) e no *locus coeruleus* (Fig. 3I).

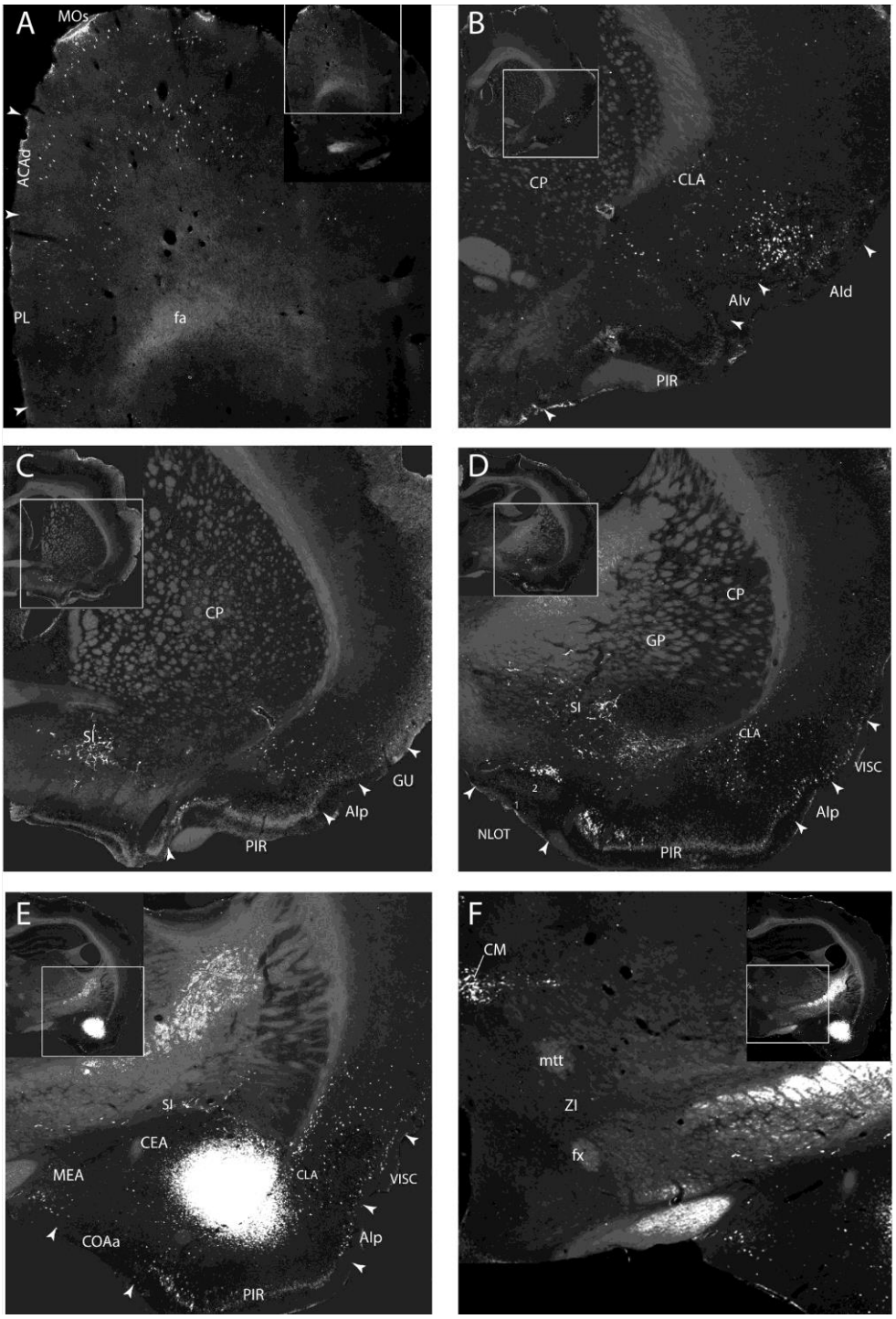

FIGURA 3 - (A - F) Microfotografia de campo escuro de secção transversal, após a injeção de FG no BLAa, mostrando as projeções de aferências.

Abreviações: AId, -p e -v, área agranular insular, parte dorsal, posterior e ventral; BLAa, núcleo amigdalar basolateral parte anterior; CEA, núcleo central da amígdala; CLA, claustro; COAa, núcleo amigdalar cortical parte anterior; CP, caudado putamem; fx, coluna do fórnice; GP, globo pálido; GU, área gustatória; IAM núcleo interanteromedial do tálamo; MEA, núcleo medial amygdalar; mtt, trato mamilotalâmico; NLOT, núcleo do trato olfatório lateral; PIR, área piriforme; SI, substantia *innominata*; VISC, área visceral; ZI, zona incerta.

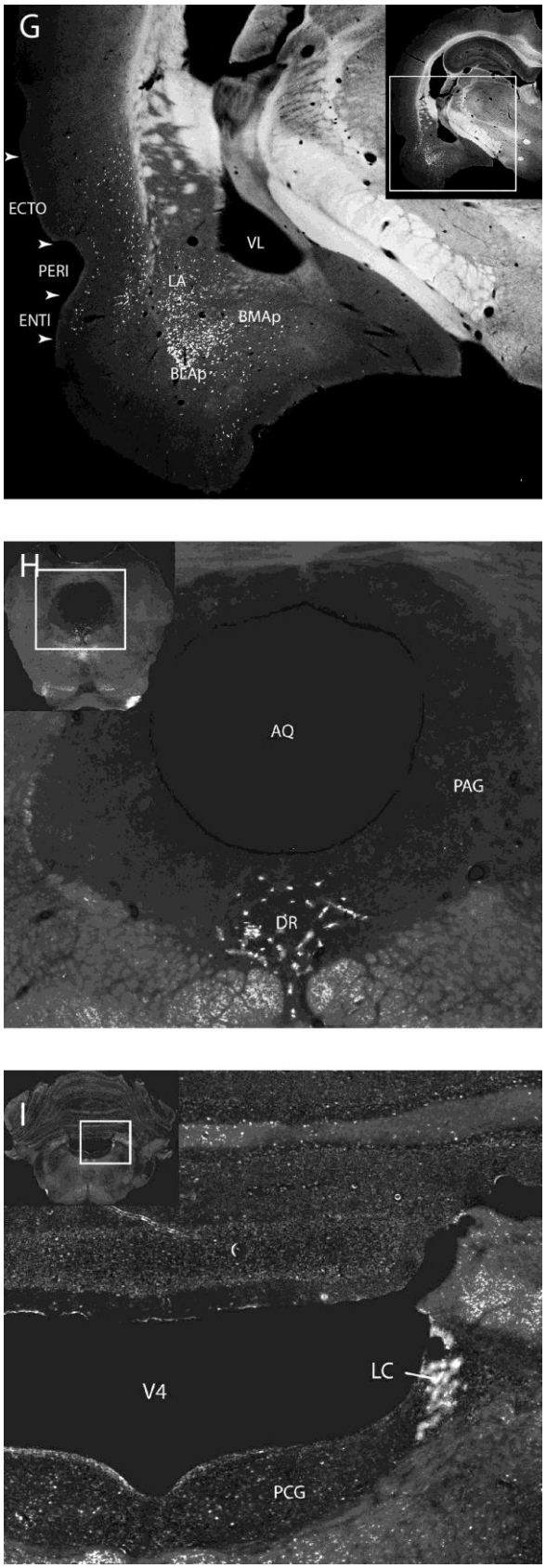

FIGURA 3 - (G - I).
Abreviações: AQ, aqueduto cerebral; DR, núcleo dorsal da rafe; LC, lócus cerúleos; PAG, substância cinzenta periaquedutal; PCG pontino central cinzento; V4, quarto ventrículo.

6.2 Resultados comportamentais

Foram excluídos da análise comportamental animais com mais de 50% do núcleo íntegro em um dos lados e com contaminação considerável de outros núcleos, principalmente pelo acometimento do LA. Na figura 5 estão representados casos da maior e da menor lesão do BLAa consideradas neste estudo. Exemplo da maior lesão está representado na figura 4.

A análise comportamental foi feita a partir de vídeos gravados durante a exposição ao gato e durante o contexto predatório. No conjunto das experimentações obteve-se um total de oito lesões restritas ao BLAa (N=8; Figura 5), sendo que apenas lesões com mais da metade do núcleo lesado dos dois lados foram consideradas.

Para diferenciarmos o LA do BLAa, nos certificamos que as lesões que acometem o BLAa estão centradas nos seus dois terços rostrais, sem nenhum comprometimento do LA.

O grupo controle, de animais sem lesão, também foi constituído de oito animais.

Apenas medidas comportamentais que resultaram em diferenças estatísticas com o alfa corrigido de 0,85% foram consideradas significantes. Para computar as diferenças nas distribuições do tempo gasto pelo animal em cada categoria comportamental e espacial, a versão não paramétrica do teste de Levene foi empregada.

Não foram encontradas diferenças nas variâncias (heterocedasticidade) entre os grupos experimentais analisados com alfa menor que 5%. Portanto o teste não paramétrico pode ser realizado.

Não sendo possível garantir a normalidade de todas as variáveis dependentes dos dados testados, a tabela 1 mostra tanto a mediana como o intervalo interquartil (IIR) que são valores não paramétricos. Todos os testes descritos estão explicitados em tabelas.

6.2.1 Resultados da habituação ao ambiente experimental

Durante o décimo dia de habituação houve diferença significativa no tempo gasto pelo animal com sua avaliação de risco, quando comparado o teste não paramétrico (α=0,002<0,0085, z= -2,911 N = 16). O animal lesado não buscou realizar qualquer avaliação de risco enquanto o animal integro gastou 51segundos (aproximadamente 9% do tempo, na mediana) avaliando o risco do ambiente (Tabela 1).

6.2.2 Resultados da exposição ao predador (gato)

Durante a exposição ao predador foram encontradas diferenças significavas entre os tempos que os ratos lesados dispenderam em avaliação de risco e entre os tempos que os ratos ocuparam fazendo congelamento. Isso comparando os grupos lesado e de controle. As diferenças de significância para avaliação de risco e congelamento foram, respectivamente, α=0,006<0,0085, z= -2,731 e α=0,003<0,0085, z= -2,941, para N = 16.

O grupo com o BLAa comprometido passou menos tempo em seu comportamento de defesa (congelamento) e mais tempo fazendo avaliação de risco (soma de: "*Streatch Attend", "Streatch Approach" e "crouch sniff")* (Tabela 1).

6.2.3 Resultados no contexto em que ocorrera a exposição ao predador

Nas medidas espaço-temporais, durante a exposição ao contexto predatório, o tempo dispendido, na mediana, no compartimento em que se oferecia anteriormente comida, foi maior no animal lesado que o integro (α=0,003<0,0085, z= -2,949 N = 16).

Nas medidas comportamentais constatou-se que, no grupo lesado, os animais dispenderam mais tempo com explorações e menos tempo avaliando riscos, em comparação com o grupo integro. (α=0,000<0,0085, z= -3,361 e α=0,000<0,0085, z= -3,258, respectivamente, N = 16).

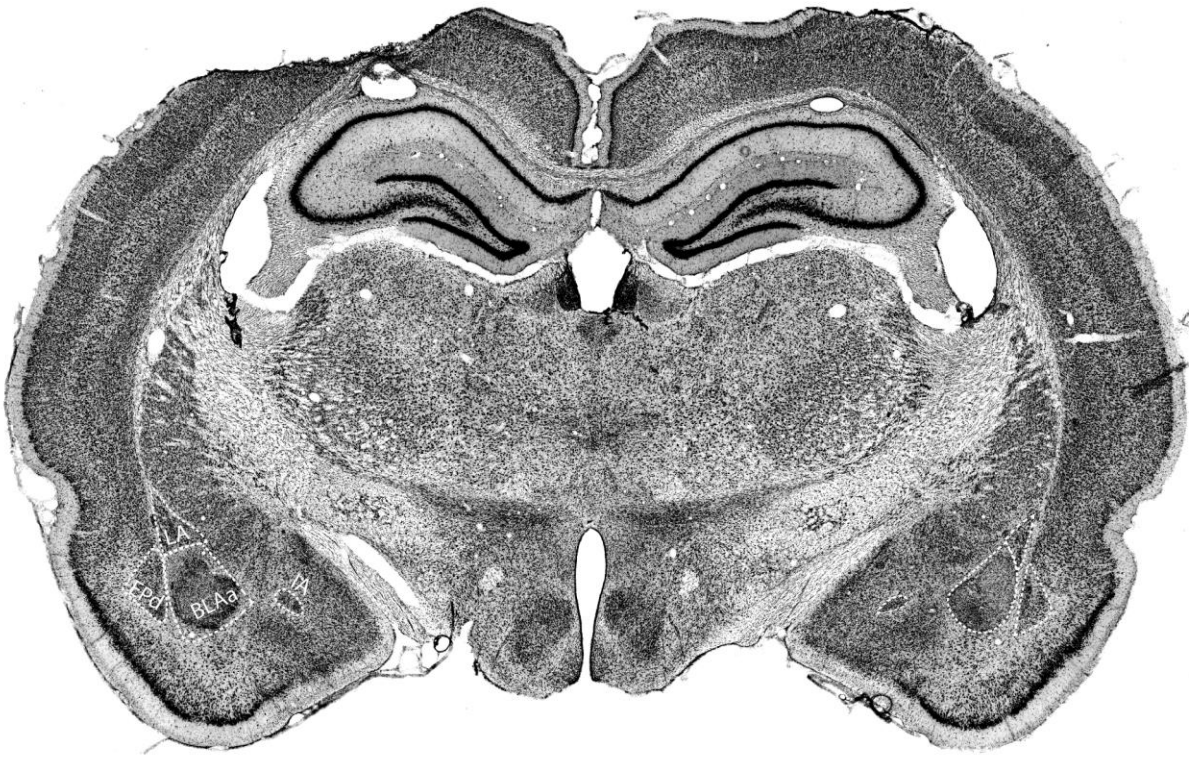

FIGURA 4 - Exemplo de um corte histológico com marcação de nissl do animal com a maior lesão do BLAa.

Abreviações: BLAa, núcleo basolateral da amígdala; EPd, endopiriforme; IA, núcleo intercalado da amígdala

TABELA 1 – Resultados das medidas espaço-temporais e dos itens comportamentais durante os dias: de habituação, exposição ao gato e exposição ao contexto.

Período: Habituação		**Integro (n=8)**		**BLAa (n=8)**			
		Mediana	**IIQ**	**Mediana**	**IIQ**	**z**	**p**
Medidas espaço-temporais	Cx. Moradia	97	106	151	120	-1,365	0,195
	Corredor	373	150	241	56	-1,680	0,105
	Comida	147	89	208	131	-0,840	0,442
Itens comportamentais	Exploração	528	81	572	36	-1,260	0,234
	Av. Risco	51	51	0	2	-2,911	0,002*
	Congelamento	0	0	0	0	0,000	1,000
Período: Gato		**Integro (n=8)**		**BLAa (n=8)**			
		Mediana	**IIQ**	**Mediana**	**IIQ**	**z**	**p**
Medidas espaço-temporais	Cx. Moradia	594	66	474	190	-2,539	0,009
	Corredor	6	66	126	190	-2,539	0,009
	Comida	0	0	0	0	0,000	1,000
Itens comportamentais	Exploração	7	13	72	131	-2,381	0,015
	Av. Risco	152	127	317	121	-2,731	0,005*
	Congelamento	440	141	132	252	-2,941	0,002*
Período: Contexto		**Integro (n=8)**		**BLAa (n=8)**			
		Mediana	**IIQ**	**Mediana**	**IIQ**	**z**	**p**
Medidas espaço-temporais	Cx. Moradia	433	259	194	118	-2,102	0,037
	Corredor	114	239	257	75	-1,787	0,080
	Comida	34	64	120	96	-2,949	0,002*
Itens comportamentais	Exploração	76	116	502	79	-3,361	0.000*
	Av. Risco	506	110	35	84	-3,258	0.000*
	Congelamento	6	12	0	0	-2,554	0,026

Abreviações: IIQ, intervalo interquartil; p, nível de significância do teste estatístico aplicado

FIGURA 5 – Representação da maior e menor lesão da BLAa nos casos selecionados em preto e cinza respectivamente. Representados em cortes, nos níveis 24 a 29 do atlas.

Fonte do atlas: Swanson, 2004.

7 DISCUSSÃO DA PROJEÇÕES

7.1 Aferências

Investigamos as projeções aferentes para o BLAa usando o Fluoro-Gold (FG) como traçador retrógrado. Esta técnica de rastreamento retrógrado é extremamente sensível, particularmente quando visualizada por método imuno-histoquímico. Notamos que o BLAa recebe aferências de diversas áreas corticais, em particular dos córtices pré-frontal, insular e para-hipocampal.

No córtex pré-frontal, os resultados mostraram uma moderada marcação retrógrada nos córtices pré-límbico, cingulado anterior dorsal e motor suplementar. Estudos de rastreamento anterógrado usando a técnica do *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) mostram que o córtex pré-limbico provê um campo de projeção moderado para o BLAa, que interessantemente representa o principal alvo do córtex pré-límbico para a amígdala (VERTES, 2004). Aferências para o BLAa do córtex cingulado anterior foram anteriormente reportadas por Ottersen (1982) com o uso da técnica do HRP. Um estudo feito em macacos (Saimiri) com traçador anterógrado autorradiográfico na área motora suplementar, verificou que ela se projeta para o núcleo basolateral (JÜRGENS, 1984).

Nas regiões insulares, notamos uma marcação retrógrada substancial no córtex agranular insular dorsal que se estende caudalmente para os córtices agranular insular posterior e visceral. Em consonância com os nossos achados, estudos com rastreamento anterógrado com a técnica da autorradiografia mostraram em hamster projeções densas do córtex agranular insular dorsal para o BLAa (REEP; WINANS, 1982b). Projeções dos córtices agranular insular posterior e visceral adjacente foram também confirmadas anteriormente no estudo de rastreamento retrógrado de Ottersen (1982) com injeções de HRP no BLAa.

Na região para-hipocampal, os resultados mostraram marcação retrógrada conspícua nos córtices perirhinal e entorrinal lateral. Estudos com rastreamento anterógrado confirmam a projeção da área perirhinal para o BLAa (PITKÄNEN et al., 2000). Projeções do córtex entorrinal lateral para o BLAa foram anteriormente reportados tanto por métodos anterógrados (SWANSON; KÖHLER, 1986) como por métodos retrógrados (OTTERSEN, 1982). Assim, de forma similar aos nossos achados, com injeção de HRP no BLAa, Ottersen (1982) reportou células marcadas na região dorsal do córtex entorrinal lateral.

Na amígdala, destacamos fontes de projeções particularmente densas do núcleo do trato olfatório lateral (NLOT) e da parte posterior do núcleo basolateral posterior. Notamos que a camada 3 do NLOT apresentava um número substancial de células retrogradamente marcadas bilateralmente, sendo estes achados em concordância com estudo com rastreamento anterógrado de PHA-L, que demonstra projeções densas do NLOT para o BLAa bilateralmente (SANTIAGO; SHAMMAH-LAGNADO, 2004). Projeções do BLAp para o BLAa também foram anteriormente sugeridas com o uso de traçador anterógrado (KRETTEK; PRICE,1977).

Destacamos no prosencéfalo basal um grande agregado celular na substância inominada. Semelhantemente aos nossos achados, OTTERSEN (1980) usando rastreamento retrógado com HRP também observou uma projeção difusa da substância inominada para o BLAa. Como mencionado anteriormente, este agregado celular é composto por células grandes com notável ramificação dendrítica, e deve representar uma população de células colinérgicas do prosencéfalo basal (WOOLF; BUTCHER, 1982).

No tálamo, destacamos marcação retrógrada conspícua nos núcleos central medial e paraventricular posterior. Em acordo com as nossas observações, experimentos utilizando HRP como traçador retrógrado mostram os núcleos talâmicos central medial e paraventricular posterior como importantes aferências talâmicas para o BLAa (OTTERSEN; BEN-AIR, 1979).

Finalmente, no tronco encefálico, os resultados mostraram células retrogradamente marcadas restritas ao núcleo dorsal da raphe e ao *locus coeruleus*. Estudos de rastreamento anterógrado (VERTES, 1991), comprovam que o núcleo dorsal da raphe prove uma projeção substancial para o BLAa. Semelhantemente, estudos com rastreamento autorradiográfico também demonstraram a projeção do *locus coeruleus* para o BLAa (JONES; YANG, 1985).

7.2 Eferências

Foram examinadas as projeções eferentes do BLAa com o uso do traçador anterógrado amina dextrana biotinilada (BDA). As injeções ficaram restritas ao BLAa.

O BLAa se projeta para diversas áreas corticais, tais como, os córtices pré-frontal, insular e para-hipocampal. No córtex pré-frontal, observamos uma densa marcação anterógrada nos córtices pré-limbico, cingulado anterior dorsal e motor suplementar. Congruente ao constatado previamente por experimentos, servindo-se de um traçador anterógrado autorradiográfico foi demonstrado, que o BLAa se projeta para os córices pré-

limbico e cingulado anterior dorsal (KRETTEK; PRICE, 1977). Em um estudo feito em macacos (Saimiri) com uso da técnica do HRP constatou que a área motora suplementar recebe projeções do núcleo basolateral (JÜRGENS, 1984). Nas regiões insulares, vemos densas marcações de fibras no córtex agranular insular dorsal, que se estende caudalmente para o córtex agranular insular ventral, e em menor quantidade para a parte posterior, onde encontramos projeções restritas às camadas profundas junto ao claustrum. Confirmando o que foi visto por Krettek e Price (1977), em um estudo feito tanto em ratos quanto em gatos, com traçador anterógrado que mostra que o BLAa se projeta nas duas espécies, tanto para parte anterior, quanto para parte posterior do córtex agranular insular dorsal, e também, para camadas mais profundas do agranular insular ventral. Na região para-hipocampal, vimos que o BLAa se projeta esparsamente para as camadas profundas do córtex perirrinal, confirmando também o que foi observado em um experimento com traçador anterógrado (KRETTEK; PRICE, 1977).

O BLAa provê projeções particularmente densas para diversas regiões estriais. Assim, campos de projeções densos foram encontrados no tubérculo olfatório, núcleo acúmbens (ACB) e caudoputamem (CP). Em consonância com estas observações, estudos com traçadores retrógados no CP (principalmente a parte dorsomedial) (MCDONALD, 1991; PHILLIPSON; GRIFFTHS, 1985) e no ACB (MCDONALD, 1991) mostram marcação retrógrada substancial no BLAa. Consolidando assim, as observações feitas previamente por Krettek e Price (1978), através de traçadores autorradiográfico, que mostram que o BLAa se projeta densamente para o ACB e CP. Neste estudo, Krettek e Price (1978) também notaram que o BLAa se projeta densamente para o tubérculo olfatório.

Na amígdala, encontramos projeções relativamente restritas. Em particular, constatamos que o BLAa se projeta densamente para o núcleo do trato olfatório lateral (NLOT). Percebemos também projeção moderada para a região capsular do núcleo central e mais caudalmente projeção intensa para a parte posterior do núcleo basolateral (BLAp). Vemos ainda que um pequeno número de fibras que se projeta para o núcleo lateral (LA). Nossos achados são corroborados pelo trabalho de Savander et al. (1995), com o traçador anterógrado PHA-L, que observou que o BLAa se projeta densamente para o NLOT, para toda o núcleo basal, incluindo o BLAp, e mais moderadamente para parte capsular do núcleo central.

8 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS COMPORTAMENTAIS

Os resultados do presente estudo mostraram que o BLAa está envolvido tanto nas respostas inatas como contextuais em relação a exposição predatória. Assim durante a exposição ao gato notamos que os animais lesados diminuíram o tempo de congelamento a aumentaram a avaliação de risco, e durante o contexto predatório, notamos uma redução drástica do comportamento de avaliação de risco, aumento da exploração e aumento do tempo na caixa onde se encontrava o predador. Além disso, notamos que os animais com lesões do BLAa passarram menos tempo avaliando risco no último dia da habituação. Tais resultados mostram o envolvimento do BLAa nos comportamentos de defesa e avaliação de risco, tanto para o medo inato quanto para o medo aprendido.

Até onde pudemos constatar não há nenhum estudo que se restringe a lesar o BLAa em situações de medo incondicionado e condicionado. Um estudo anterior mostrou que lesões por NMDA e inativações por lidocaína do complexo basolateral provocaram uma redução no tempo executando comportamentos de defesa (congelamento) e também levaram a uma redução no tempo que o os animais evitaram contato com o cheiro do gato (VAZDARJANOVA et al., 2001). Entretanto, cabe ressaltar que em tal estudo houve um amplo comprometimento do lateral da amígdala (e não apenas do BLAa). Outro aspecto diferencial nesse estudo foi o uso do cheiro de gato como US, um estímulo de menor saliência quando comparado à exposição ao predador. Um outro estudo avaliou os efeitos de lesões com ácido ibotênico e inativações por meio de microinjeções de muscimol no BLA durante a expressão de comportamentos de defesa (TAKAHASHI et al., 2007). Esse estudo mostrou que a lesão do BLA reduziu o tempo de congelamento não condicionado e condicionado além de reduzir o comportamento de evitação frente ao cheiro do gato. Nesse mesmo estudo, as lesões e inativações também comprometeram o LA e não foram restritas ao BLAa. Um estudo mais recente mostrou que lesões no complexo BLA bloquearam completamente a resposta de fuga evocada por estimulação na parte dorsal da PAG, sugerindo que o complexo basolateral da amígdala está a jusante dos comportamentos mediados pela PAG dorsal (KIM et al., 2013).

Um estudo do nosso grupo de pesquisa mostrou que o BLAa apresentou um aumento numérico de aproximadamente 1,8 vezes maior na expressão de proteína FOS comparando a exposição com gato e um ambiente seguro (MARTINEZ et al., 2011). Um outro trabalho mostrou que houve um aumento significativo em células positivamente marcadas para FOS, no BLA no grupo de ratos expostos à um furão (ROSEBOOM et al., 2007). Assim, o BLAa parece responder à presença da ameaça predatória, embora não receba aferências de regiões

encefálicas responsáveis pelo processamento de informações de feromônios, fundamentais para perceber a presença do predador, como é o caso de outras estruturas amigdaloides, como o LA e o BMAp, que influenciam diretamente o circuito de defesa do hipotálamo medial (CANTERAS et al., 1995).

De acordo com os dados de projeção do BLAa, temos que esta região não se relaciona diretamente com o circuito amigdalar-hipotalâmico que está ligado às respostas anti-predatórias. Desta forma, necessitamos saber como o BLAa pode influenciar tanto as respostas inatas como contextuais da ameaça predatória.

Uma possível explicação é que a atividade dos neurônios do BLAa frente à ameaça predatória deve refletir a mobilização de estruturas envolvidas no controle do alerta, como o *locus coeruleus*, o núcleo dorsal da rafe e células colinérgicas do prosencéfalo basal (substância *innominata*), que aferentam o BLAa. Estudo prévios mostraram um aumento na expressão de proteína FOS durante a exposição ao predador no núcleo dorsal da rafe (COMOLI et al., 2003) e no *locus coeruleus*, o qual apresentou um aumento maior que 37 vezes em relação a situação basal (RIBEIRO-BARBOSA et al. 2005). Uma teoria proposta em um estudo de revisão por ASTON-JONES; COHEN (2005) sugere que o *locus coeruleus* tem dois modos de ativação, um fásico e outro tônico, o primeiro ligado otimizar a tarefa e o segundo associado com a procura por comportamentos alternativos (exploração). Em relação a substância *innominata*, suas projeções colinérgicas para o córtex pré-frontal estão relacionadas a uma mudança de estratégia comportamental de uma resposta de congelamento para comportamentos de avaliação de risco (GOZZI et al., 2010). Sendo assim, o BLAa ocupa uma posição especial integrando informações de áreas noradrenérgicas do *locus coeruleus*, serotonérgicas do núcleo dorsal da rafe e colinérgicas da substância *innominata*, ligadas ao controle do alerta e formação de memória.

Outra possível explicação é que o núcleo acúmbens, uma das principais eferências do BLAa, tem sido foi implicado no processamento das respostas defensivas (RICHARD; BERRIDGE, 2011). Especificamente os comportamentos defensivos precisam da sinalização de receptores dopaminérgicos D1 e D2 na parte caudal do núcleo. Também foi visto que bloqueando o receptor AMPA (glutamatérgico) na parte caudal do núcleo acúmbens acentuam-se os comportamentos de medo (RICHARD; BERRIDGE, 2011). Ademais, a mudança de ambiente familiar para um ambiente estressante é provavelmente modulada por mudanças da circuitaria mesolímbica, provavelmente alterando os inputs glutamatérgicos como os do BLA (RICHARD; BERRIDGE, 2011). Outrossim foi visto que a ativação do subículo ventral é necessária para que o BLA consiga ativar o núcleo acúmbens. Além disso a

ativação dos receptores D2 do BLA está envolvida na plasticidade do núcleo acúmbens. Também temos que a estimulação do BLA por teta de alta frequência causa plasticidade de potenciação de longo prazo (LTP) na parte caudal do núcleo acúmbens e depressão de longo prazo (LTD) na parte rostral (GILL; GRACE, 2011). Desta forma, postulamos que as projeções do BLAa para o núcleo acúmbens possam, em parte, mediar a sua influência nas respostas de defesa inata frente o predador.

Com relação ao BLAa e seu envolvimento nas respostas de medo contextual, primeiramente, existem muitos mecanismos que podem explicar como o BLAa está envolvido em processos mnemônicos. Como já foi discutido, o BLAa está em uma posição privilegiada para receber informações ligadas a processos atencionais reconhecidamente envolvidos em processos mnemônicos. Assim, por exemplo, é amplamente sabido que a modulação noradrenérgica influencia os processos de consolidação de memórias emocionais, que pode ser bloqueada por propanolol (um antagonista β-adrenérgico) (HATFIELD; MCCGAUGH, 1999; ROOZENDAAL et al., 2006). O BLAa também se projeta para o LA, considerado como uma estrutura crítica para a aquisição da memória de medo, onde recentemente foram identificadas alterações neuronais potencialmente relacionadas ao engrama da memória de medo, ou seja, mudanças físicas dos circuitos neurais potencialmente envolvido nos processos de codificação da memória (BUTLER et al., 2017). Durante o condicionamento de medo, o LA é uma interface crítica para a associação entre os estímulos condicionados e incondicionados (CS+US) (BLAIR et al., 2001). Estudos eletrofisiológicos mostraram que neurônios do LA aumentam a resposta ao CS durante o condicionamento de medo (JOHANSEN et al., 2010). Assim, a convergência entre CS-US no LA leva a alterações plásticas que aumentam a atividade nos neurônios do LA frente ao CS (BLAIR et al., 2001). Além destas alterações eletrofisiológicas, os neurônios do LA exibem mudanças na expressão gênica e fosforilação proteica após o condicionamento de medo (ver JOHANSEN et al., 2011). Por fim, como discutido anteriormente, a lesão deste núcleo bloqueia o medo contextual a ameaças predatórias (MARTINEZ et al., 2011).

Como ilustrado na figura 6, o BLAa tem conexões bidirecionais com o córtex pré-frontal e a região para-hipocampal que participam da aquisição e expressão do medo ao predador. Sabe-se que inativações do circuito hipotalâmico de defesa interferem na aquisição das respostas contextuais à ameaça predatória (GROSS E CANTERAS, 2012). A parte ventral do núcleo anteroventral do tálamo (AMv) é um alvo importante deste circuito hipotalâmico e, recentemente, mostrou-se em nosso laboratório que a inativação deste sítio

talâmico afeta a aquisição, mas não a expressão da memória contextual de medo ao predador (DE LIMA et al., 2017). O AMv se projeta para uma rede cortical composta pelas áreas pré-limbica, cingulada anterior, visual associativa e retroesplenial (DE LIMA et al., 2017). Estudos de nosso laboratório mostraram que lesões isoladas de cada uma destas áreas prejudicam a aquisição da memória contextual ao predador (DE LIMA, 2015). Também temos que o BLAa se projeta reciprocamente para o córtex pré-limbico e área cingulada anterior, estruturas previamente implicadas em memória de medo, portanto fica em uma posição privilegiada para afetar este circuito. Assim é esperado que lesões neste núcleo afetem a aquisição da memória contextual ao predador.

Entretanto, como foi vista uma redução do comportamento de defesa frente ao gato, potencialmente afetando o processo de aquisição da memória, este decréscimo pode explicar a redução observada na expressão de comportamentos de defesa durante a exposição ao contexto predatório. Para explorar melhor as influências do BLAa na aquisição ou expressão de memória contextual ao estímulo predatório, estudos posteriores com inativação deste núcleo em diferentes períodos serão necessários.

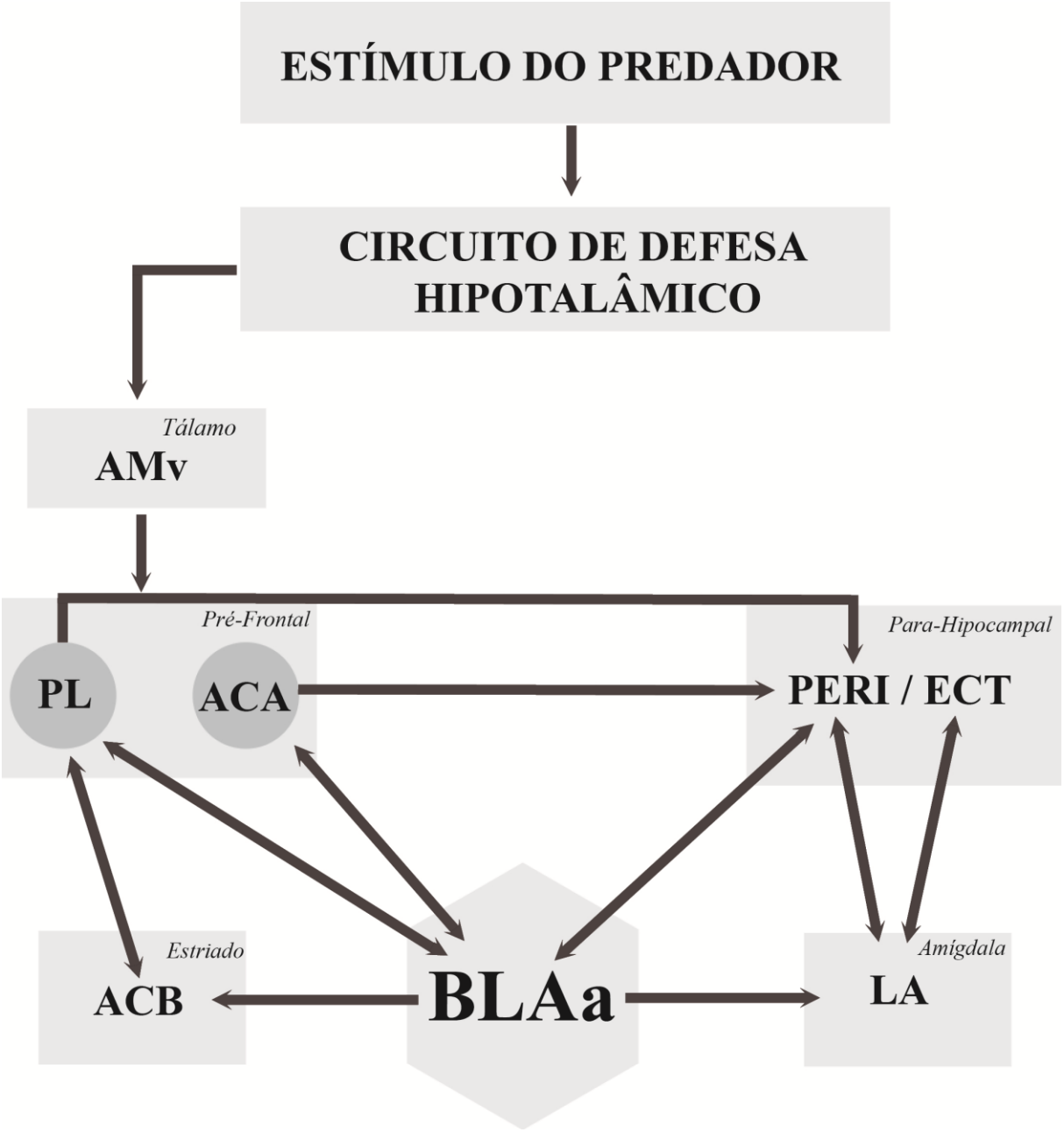

FIGURA 6 - Representação da circuitaria proposta do envolvimento BLAa no medo inato e aprendido ao predador.

Abreviações: ACA, córtex cingulado anterior; ACB, núcleo acúmbens; AMv, núcleo anteroventral do tálamo; BLAa, núcleo basolateral da amígdala; ECT, córtex ectorrinal; PER, córtex perirrinal; PL, córtex pré-limbico; LA, núcleo lateral da amígdala.

9 CONCLUSÃO

Neste trabalho revisitamos as conexões aferentes e eferentes do BLAa. Nossos achados confirmaram em grande medida os relatos anteriores da literatura e mostraram que o núcleo integra informações de sistemas relacionados ao alerta emocional (tais como o *locus coeruleus*, dorsal da rafe e substância inominada). Por outro lado, se relaciona intimamente a estruturas ligadas a circuitaria do córtex pré-frontal, como o núcleo acúmbens, o caudo-putamem dorsomedial, e os córtices pré-límbico e cingulado anterior. Também foi visto que o núcleo estabelece conexões bidirecionais importantes com o córtex insular e com a região para-hipocampal.

Do ponto de vista funcional, vimos que o BLAa influencia respostas de medo inato e contextual à ameaça predatória. Primeiramente, sugerimos que o BLAa responda à influência predatória pelos sistemas de controle de alerta emocional. Através de suas projeções para o núcleo acúmbens, sugerimos que possa influenciar as respostas de defesa inata e, através de suas relações com os córtices pré-limbico e cingulado anterior, bem como com a região para-hipocampal, possa influenciar as respostas de medo contextual condicionado ao predador.

10 REFERÊNCIAS*

ASTON-JONES, G.; COHEN, J. An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: Adaptive Gain and Optimal Performance. **Annual Review of Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 403-450, 2005.

BLAIR, H. T.; SCHAFE G. E.; BAUER E. P.; RODRIGUES S. M.; LEDOUX J. E. Synaptic Plasticity in the Lateral Amygdala: A Cellular Hypothesis of Fear Conditioning. **Learning & Memory**, v. 8, n. 5, p. 229-242, 2001.

BUTLER, C; GUNNERSEN, Y; Murphy, M. Identification of neurons required for auditory fear memory in lateral amygdala. **Learning & Memory,** 2017, no prelo.

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

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

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

DE LIMA, M.; BALDO, M.; CANTERAS, NS. A role for the anteromedial thalamic nucleus in the acquisition of contextual fear memory to predatory threats. **Brain Structure and Function**, v. 222, n. 1, p. 113-129, 2017.

FANSELOW, M.; LEDOUX, J. Why we think plasticity underlying pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. **Neuron**, v. 23, n. 2, p. 229-232, 1999.

GILL, K.; GRACE, A. Heterogeneous processing of amygdala and hippocampal inputs in the rostral and caudal subregions of the nucleus accumbens. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 10, p. 1301-1314, 2011.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

GOOSENS, K.; MAREN, S. Contextual and Auditory Fear Conditioning are Mediated by the Lateral, Basal, and Central Amygdaloid Nuclei in Rats. **Learning & Memory**, v. 8, n. 3, p. 148-155, 2001.

GOZZI, A.; JAIN, A.; GIOVANNELLI, A.; GIOVANELLI, A.; BERTOLLINI, C.; CRESTAN, V.; SCHWARZ, A. J.; TSETSENIS, T.; RAGOZZINO, D.; GROSS, C. T.; BIFONE, A. A neural switch for active and passive fear. **Neuron**, v. 67, n. 4, p. 656-66, 2010.

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

HATFIELD, T; MCGAUGH, JL. Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. **Neurobiology of learning and memory**, v. 71, n. 2, p.232-239, 1999.

INOUE, T.; KOYAMA, T.; YAMASHITA, I. Effect of conditioned fear stress on serotonin metabolism in the rat brain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 44, n. 2, p. 371-374, 1993.

JOHANSEN, J. P.; HAMANAKA, H.; MONFILS, M. H.; BEHNIA, R.; DEISSEROTH, K.; BLAIR, H. T.; LEDOUX, J. E. Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 28, p. 12692-12697, 2010.

JONES, B. E.; YANG, T. Z. The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 242, n. 1, p. 56-92, 1985.

JÜRGENS, U. The efferent and afferent connections of the supplementary motor area. **Brain Research**, v. 300, n. 1, p. 63-81, 1984.

KAPP, B. S.; FRYSINGER, R. C.; GALLAGHER, M.; HASELTON, J. R. Amygdala central nucleus lesions: effect on heart rate conditioning in the rabbit. **Physiology & Behavior**, v. 23, n. 6, p. 1109-1117, 1979.

KAWAHARA, H.; YOSHIDA, M.; YOKOO, H.; NISHI, M.; TANAKA, M. Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis.**Neuroscience Letters**, v. 162, n. 1-2, p. 81-84, 1993.

KREBS, J. R.; DAVIES, N. B. **Introdução à ecologia comportamental**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 420 p.

KRETTEK, J.; PRICE, J. Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 172, n. 4, p. 687-722, 1977.

KRETTEK, JE; PRICE, JL. Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 178, n. 2, p. 225-253, 1978.

LEDOUX, J. Emotion Circuits in the Brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 155-184, 2000.

LEDOUX, J. Rethinking the Emotional Brain. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 653-676, 2012.

LI, CI; MAGLINAO, TL; TAKAHASHI, LK. Medial amygdala modulation of predator odor-induced unconditioned fear in the rat. **Behavioral neuroscience**, v. 118, n 2, p.324, 2004.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annual review of neuroscience**, v. 24, p. 897-931, 2001.

MARKS, I.; NESSE, R. Fear and fitness: An evolutionary analysis of anxiety disorders. **Ethology and Sociobiology**, v. 15, n. 5-6, p. 247-261, 1994.

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

MCDONALD, A. J. Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. **Neuroscience**, v. 44, n. 1, p. 1-14, 1991.

MCDONALD, A. J. Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. **Neuroscience**, v. 44, n. 1, p. 15-33, 1991.

MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual review of neuroscience**, v. 27, p. 1-28, 2004

NAIRNE, J.; THOMPSON, S.; PANDEIRADA, J. Adaptive memory: Survival processing enhances retention. **Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition**, v. 33, n. 2, p. 263, 2007.

OTTERSEN, O. P. Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat: II. Afferents from the hypothalamus and the basal telencephalon. **Journal of Comparative Neurology**, v. 194, n. 1, p. 267-289, 1980.

OTTERSEN, O. P. Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat. III. Afferents from the lower brain stem. **Journal of Comparative Neurology**, v. 202, n. 3, p. 335-356, 1981.

OTTERSEN, O. P. Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. **The Journal of comparative neurology**, v. 205, n. 1, p. 30-48, 1982.

OTTERSEN, O. P.; BEN-ARI. Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat. I. Projections from the thalamus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 187, n. 2, p. 401-424, 1979.

PETROVICH, G.; RISOLD, P. Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 374, n. 3, p. 387-420, 1996.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral neuroscience**, v. 106, n. 2, p. 274, 1992.

PHILLIPSON, O. T.; GRIFFITHS, A. C. The topographic order of inputs to nucleus accumbens in the rat. **Neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 275-296, 1985.

PITKÄNEN, A.; PIKKARAINEN, M.; NURMINEN, N.; YLINEN, A. Reciprocal Connections between the Amygdala and the Hippocampal Formation, Perirhinal Cortex, and Postrhinal Cortex in Rat: A Review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 911, n. 1, p. 369-391, 2000.

REEP, R. L.; WINANS, S. S. Afferent connections of dorsal and ventral agranular insular cortex in the hamster, Mesocricetus auratus. **Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 1265-1288, 1982.

REEP, R. L.; WINANS, S. S. Efferent connections of dorsal and ventral agranular insular cortex in the hamster, Mesocricetus auratus. **Neuroscience**, v. 7, n. 11, p. 2609-2635, 1982.

RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S.; CEZARIO, A. F.; BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. An alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1255-1263, 2005.

RICHARD, J.; BERRIDGE, K. Nucleus Accumbens Dopamine/Glutamate Interaction Switches Modes to Generate Desire versus Dread: D1 Alone for Appetitive Eating But D1 and D2 Together for Fear. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 36, p. 12866-12879, 2011.

ROOZENDAAL, B.; OKUDA, S.; VAN DER ZEE, E. A.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 17, p. 6741-6746, 2006.

ROSEBOOM, P. H.; NANDA, S. A.; BAKSHI, V. P.; TRENTANI, A.; NEWMAN, S. M.; KALIN, N. H. Predator threat induces behavioral inhibition, pituitary-adrenal activation and changes in amygdala CRF-binding protein gene expression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 1, p. 44-55, 2007.

SANTIAGO, A.; SHAMMAH-LAGNADO, S. Efferent connections of the nucleus of the lateral olfactory tract in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 471, n. 3, p. 314-332, 2004.

SAVANDER, V.; GO, C. -Geneviev.; LEDOUX, J.; PITKÄNEN, A. Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: Projections originating in the basal nucleus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 361, n. 2, p. 345-368, 1995.

SWANSON, L. W. **Brain maps:** structure of the rat brain. an atlas with printed and electronic templates for data, models and schematics. 3. ed. Amsterdã: Elsevier, 2004.

SWANSON, L. W.; KOHLER, C. Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 10, p. 3010-3023, 1986.

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

TAKAHASHI, L.; HUBBARD, D.; LEE, I.; DAR, Y.; SIPES, S. M. Predator odor-induced conditioned fear involves the basolateral and medial amygdala. **Behavioral Neuroscience**, v. 121, n. 1, p. 100, 2007.

VAZDARJANOVA, A.; CAHILL, L.; MCGAUGH, J. L. Disrupting basolateral amygdala function impairs unconditioned freezing and avoidance in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 709-718, 2001.

VEIT, R.; FLOR, H.; ERB, M.; HERMANN, C.; LOTZE, M.; GRODD, W.; BIRBAUMER, N. Brain circuits involved in emotional learning in antisocial behavior and social phobia in humans. **Neuroscience Letters**, v. 328, n. 3, p. 233-236, 2002.

VERTES, R. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 313, n. 4, p. 643-668, 1991.

VERTES, R. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse**, v. 51, n. 1, p. 32-58, 2004.

WOOLF, N.; BUTCHER, L. Cholinergic projections to the basolateral amygdala: A combined Evans Blue and acetylcholinesterase analysis. **Brain Research Bulletin**, v. 8, n. 6, p. 751-763, 1982.