

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE BIOLOGIA DE SISTEMAS

RICARDO PASSONI BINDI

**COMO A PAG DORSAL CODIFICA AS RESPOSTAS DE MEDO E O ESTUDO  
ANÁTOMO-FUNCIONAL DO NÚCLEO CUNEIFORME: UM ELEMENTO  
FUNDAMENTAL PARA OS COMPORTAMENTOS DE MEDO INATO**

São Paulo

2022

RICARDO PASSONI BINDI

**COMO A PAG DORSAL CODIFICA AS RESPOSTAS DE MEDO E O ESTUDO  
ANÁTOMO-FUNCIONAL DO NÚCLEO CUNEIFORME: UM ELEMENTO  
FUNDAMENTAL PARA OS COMPORTAMENTOS DE MEDO INATO**

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

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Newton Sabino Canteras

São Paulo  
2022

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)

PASSONI BINDI, RICARDO

Como a PAG dorsal codifica as respostas de medo e o estudo anátomo-funcional do núcleo cuneiforme: um elemento fundamental para os comportamentos de medo inato. / RICARDO PASSONI BINDI; orientador Newton Sabino Canteras. -- São Paulo, 2022.

88 p.

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

1. Medo. 2. PAG. 3. Comportamentos defensivos. 4. Núcleo Cuneiforme. 5. Circuito de medo mesencefálica. I. Sabino Canteras, Newton, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Ricardo Passoni Bindi

Título da Dissertação/Tese: Como a PAG dorsal codifica as respostas de medo e o estudo anátomo-funcional do núcleo cuneiforme: um elemento fundamental para os comportamentos de medo inato

Orientador: Dr. Newton Sabino Canteras

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada no dia **14/12/2022**, considerou o candidato:

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

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

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

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

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





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

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

Ao Prof. Dr. Colin Lever e ao Prof. Dr. Steven Poulter de Durham, por terem me oferecido conhecimento e treinamento necessários para realizar os registros eletrofisiológicos. Pelo incentivo e suporte, tanto pessoal quanto profissional.

Aos membros do Laboratório de Neuroanatomia Funcional, em especial ao Dr. Miguel Xavier, Dr. Miguel Rangel, Dr. Fernando Melleu e à Amanda Ribeiro, técnica especialista em laboratório.

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

A minha esposa, Dr.<sup>a</sup> Paula, por auxiliar na correção deste trabalho, manter-me concentrado e calmo durante a execução da pesquisa bem como por todo o suporte emocional.

Aos meus irmãos, agradeço particularmente ao fluxo contínuo de produção de novos sobrinhos ao longo da minha jornada científica.

Ao meu pai, Carlos, por me criar como pensador e homem com valores éticos e morais. Um homem que tive sempre como exemplo a seguir.

A minha mãe, Vanda, um dos pilares na minha formação como ser humano, pela excelente mulher que ela é e por todo o seu apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (processo n.º 2018/00576-3).

## RESUMO

BINDI, R. P. **Como a PAG dorsal codifica as respostas de medo e o estudo anátomo-funcional do núcleo cuneiforme:** um elemento fundamental para os comportamentos de medo inato. 2022. 88 f. Defesa (Doutorado em Biologia Morfofuncional) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O medo é uma emoção que surge em uma situação ou percepção de uma ameaça potencial à sobrevivência, seja direta ou indireta. Várias regiões do cérebro têm sido estudadas para entender essa emoção, desde o tronco encefálico até o córtex cerebral. No laboratório de Neuroanatomia Funcional (USP), foi observada uma relação anatômica robusta entre a matéria cinzenta periaquedutal (PAG) e o núcleo cuneiforme, duas regiões vizinhas. Após expor animais a um predador natural e seu cheiro, há um aumento na expressão da proteína FOS no núcleo cuneiforme e na PAG dos animais expostos. A estimulação, tanto da PAG dorsal quanto do cuneiforme, evoca comportamentos defensivos, enquanto a inibição da PAG reduz os comportamentos de medo frente a uma ameaça predatória, além de existir uma relação direta da atividade elétrica com comportamentos defensivos. Apesar dos estudos funcionais e anatômicos, ainda são escassos na literatura estudos sobre o núcleo cuneiforme na modulação comportamental do animal e de conhecimento sobre a atividade da PAG dorsal sob diferentes níveis de medo. A partir deste estudo, nota-se que a atividade das células observadas da PAG dorsal tem relação direta com o nível de ameaça. Já a relação com o comportamento é secundária. O núcleo cuneiforme conecta-se ao circuito de ameaça predatória e, devido às relações hodológicas e funcionais, atua como componente caudal da PAG. Esse núcleo recebe informações do sistema de defesa hipotalâmico, integrando pistas predatórias, da parte medial do colículo superior, que responde a sombras iminentes no campo visual superior. Também integra informações da parte magnocelular do núcleo subparafascicular do tálamo, que integra as informações nociceptivas, e da região peripeduncular, que integra as informações nociceptivas e auditivas. Dessa forma, o núcleo cuneiforme ocupa uma posição privilegiada para integrar uma ampla gama de informações que representam potenciais ameaças à vida do indivíduo. O núcleo cuneiforme projeta-se para elementos do circuito de defesa hipotalâmico e estabelece uma projeção bidirecional particularmente densa com a parte dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal. No entanto, não existem informações suficientes sobre o papel funcional desse núcleo e, por esse motivo, o foco deste trabalho foi o estudo funcional do núcleo cuneiforme com técnicas de estimulação optogenética e inibição farmacológica. Neste estudo, a ativação optogenética do núcleo cuneiforme promove comportamentos defensivos e inibe a caça. Além disso, percebeu-se que a inativação do núcleo cuneiforme durante a exposição ao gato (ameaça predatória) reduz o comportamento de congelamento motor.

**Palavras-chaves:** Medo; PAG; Comportamentos defensivos; Núcleo Cuneiforme; Circuito de medo mesencefálica.

## ABSTRACT

Fear is an emotion that emerges in a situation or perception of a potential threat to survival, whether direct or indirect. Researchers have studied various brain regions to understand this emotion, from the brainstem to the cerebral cortex. At the laboratory of Functional Neuroanatomy (USP), a robust anatomical relationship was observed between the periaqueductal gray area (PAG) and the cuneiform nucleus, two neighboring regions. After exposing animals to a natural predator and its scent, studies showed an increase in FOS protein expression in the cuneiform nucleus and the PAG of exposed animals. The literature also shows that dorsal PAG and cuneiform nucleus activation evoke defensive behaviors, and PAG inhibition reduces fearful behaviors in the face of a predatory threat, in addition to showing a direct relationship between electrical activity and defensive behaviors. Despite the functional and anatomical studies, there is still a lack of studies relating the cuneiform nucleus to behavioral modulation. In addition, the PAG activity pattern under increasing levels of threats was unknown. Those blind spots guided our efforts to study the cuneiform nucleus and dorsal PAG. Our observations indicate that the activity of observed dorsal PAG cells has a strong direct relationship with threat level, and the relationship with behavior is secondary. The cuneiform nucleus connects to the predatory threat circuitry, and due to the hodological and functional relationships, it acts as a caudal component of the PAG. This nucleus receives information from the hypothalamic defense system (integrating predatory cues) from the medial part of the superior colliculus (which response to looming shadows in the superior visual field). It also integrates information from the magnocellular part of the subparafascicular nucleus of the thalamus (which integrates nociceptive information) and the peripeduncular region (which integrates nociceptive and auditory information). In this way, the cuneiform nucleus occupies a privileged position to integrate a wide range of information that represents a potential threat to the individual's life. The cuneiform nucleus, in turn, projects to elements of the hypothalamic defense circuit and establishes a particularly dense bidirectional projection with the dorsolateral PAG. However, until now, there is not enough information about the functional role of this nucleus. To remedy this situation, the focus of this work was the functional study of the cuneiform nucleus with optogenetic stimulation and pharmacological inhibition techniques. In our study, optogenetic activation of the cuneiform nucleus promotes defensive behaviors and inhibits hunting. We also saw that inactivation of the cuneiform nucleus during exposure to the cat (predatory threat) reduces freezing behavior.

**Keywords:** Fear; PAG; Defensive behaviors; Cuneiform nucleus; Mesencephalic fear circuitry.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACB	núcleo <i>accumbens</i>
AHN a, c, p	núcleo hipotalâmico anterior, partes: anterior, central, posterior
B	núcleo de Barrington
BST se, pr, tr	núcleos do leito estria terminal, núcleos interfasciculares, principais e transversos
CEA c, l, m	núcleo central da amígdala, partes capsular, lateral e medial
CM	núcleo medial central do tálamo
cpd	pedúnculo cerebral
SC	núcleo central superior da rafe
CUN	núcleo cuneiforme
da	grupo celular dopaminérgico da zona incerta
DMHa	núcleo hipotalâmico dorsomedial, parte anterior
RD	rafe do núcleo dorsal
DTN	núcleo tegmental dorsal
fr	fascículo retroflexo
fx	fórnix;
GP	globo pálido;
GRN	núcleo reticular gigantocelular
gVII	joelho do nervo facial
DAI	núcleo interanterodorsal tálamo
IAM	núcleo interanteromedial do tálamo
IC	colículo inferior; III – núcleo oculomotor
LDT	núcleo tegmental látero-dorsal
LHAad	área hipotalâmica lateral, região anterior, zona dorsal
LHAai	área hipotalâmica lateral, região anterior, zona intermediária
LHAav	área hipotalâmica lateral, região anterior, zona ventral
LHAjd	área hipotalâmica lateral, região justadorsomedial
LHAjp	área hipotalâmica lateral, região justaparaventricular
LHAp	área hipotalâmica lateral, região posterior
LHASf	área hipotalâmica lateral, região subfornical
LHASfpm	área hipotalâmica lateral, região subfornical, zona pré-mamilar
LM	núcleo mamilar lateral
LP	núcleo lateral posterior do tálamo
LS v, i	núcleo sptal lateral, partes ventral e intermediária
MARN	núcleo reticular magnocelular
MD	núcleo mediodorsal do tálamo
MEA	núcleo amigdalar medial
MG d, m, v	complexo geniculado medial, partes dorsal, medial e ventral
MI	lemnisco medial
MM	núcleo mamilar medial
NMP	núcleo pré-óptico medial
MRN	núcleo reticular do mesencéfalo
MS	núcleo septal medial
mtt	trato mamilotalâmico
ND	núcleo de Darkschewitsch
opt	trato óptico
PAG	substância cinzenta periaquedutal

d, dl, dm, l, vl	porções da substância cinzenta periaquedutal, dorsal, dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral
PARN	núcleo reticular pavicelular
PB l, m	núcleo parabraquial, partes: lateral e medial
Pc	comissura posterior
PH	núcleo hipotalâmico posterior
Pm	trato mamilar principal
PMd	núcleo pré-mamilar dorsal
PMv	núcleo pré-mamilar ventral
PP	área peripeduncular
NPP	núcleo pedunculopontino
PRC	núcleo pré-comissural
PRN c, r	núcleo reticular pontino, partes: caudal e rostral
PSTN	núcleo parasubtalâmico
PT	núcleo paratenial tálamo
PVH	núcleo hipotalâmico paraventricular
PVT	núcleo talâmico paraventricular
RE	núcleo reuniens
RM	núcleo magno da rafe
RN	núcleo vermelho
RR	área retrorubral
RT	núcleo reticular do tálamo
SC dg, ig, sg	colículo superior, cinza profundo, cinza intermediário, cinza superficial
scp	pedúnculo cerebelar superior
SGN	núcleo supragenicolado
SI	substância inominada
sm	estria medular
SN c, r	substância negra, partes compactas e reticulares
SO	núcleo supraóptico
FPS m, p	núcleo subparafascicular tálamo, partes magnocelular e parvicelular
NST	núcleo subtalâmico
SUM	núcleo supramamilar; sup – comissuras supra-ópticas
TMv	núcleo tuberomamilar, parte ventral
TRN	núcleo reticular tegmentar
VII	núcleo facial
VMH	núcleo hipotalâmico
c, dm, vl	ventromedial, partes central, dorsomedial e ventrolateral
VTA	área tegmental ventral
VTN	núcleo tegmental ventral
ZI	zona incerta

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1	SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL .....	11
1.2	NÚCLEO CUNEIFORME.....	15
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	22
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3	<b>ARTIGOS: RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	23
3.1	ARTIGO I: NEURAL CORRELATES OF DISTINCT LEVELS OF PREDATORY THREAT IN DORSAL PERIAQUEDUCTAL GRAY NEURONS. ....	23
3.2	ARTIGO II: ANATOMICAL AND FUNCTIONAL STUDY OF THE CUNEIFORM NUCLEUS.....	28
4	<b>CONCLUSÕES</b> .....	32
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	33

# 1 INTRODUÇÃO

A emoção do medo é evocada frente a uma situação ameaçadora, que leva a uma série de comportamentos motivados para evitá-la e aumentar as chances de sobrevivência. A fim de mitigar dúvidas epistemológicas, tornar o uso do termo funcional e o entendimento mais objetivo, é necessário definir essa emoção. O medo é o estado emocional central provocado por um ou mais estímulos ameaçadores ou potencialmente ameaçadores, por associação ou contextualização. Tal estado emocional evoca uma série de comportamentos estereotipados, que coincidem com estímulos aversivos. Na neurociência afetiva e comportamental, os estudos das circuitarias neurais permitem avaliar e ajudar no entendimento de como certos estímulos estão ligados a alguns comportamentos (ADOLPHS, 2013).

Os estudos em roedores citados ao longo desta pesquisa mostram detalhes de como cada pequena parte do sistema nervoso pode estar envolvida no medo, com minúcias sobre neurotransmissores, regiões e circuitos. Esses estudos teriam pouca aplicação clínica se a defesa frente à situação ameaçadora não fosse basilar para sobrevivência da espécie e, por consequência, conservado filogeneticamente. Apesar de possíveis aplicações clínicas, é necessário diligência na investigação para evitar que humanos passem por experimentos com tratamentos ineficazes, conforme ocorreu em pacientes com Parkinson, em ensaio clínico com estimulação cerebral profunda no núcleo cuneiforme (CUN) (BOURILHON *et al.*, 2022). Existem várias vias neurais para diferentes medos, com caminhos e regiões diversas, que respondem diferencialmente a estímulos contra o predador, agressividade de um coespecífico e estímulos previamente pareados à dor (GROSS; CANTERAS, 2012). Esta melhor contribui para o conhecimento da importância de estruturas mesencefálicas, como a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e o núcleo cuneiforme (CUN).

## 1.1 SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL

A CUN e a PAG têm íntima relação, tanto hodológica quanto funcional, com diversas vias ligadas ao medo (artigo II). Em predadores, como uma cobra ou gato frente a um rato, foi observada atuação de circuitos distintos (MENDES-GOMES *et al.*, 2020). A amígdala (lateral e basolateral anterior) tem ampla atuação, integrando informação de diversas fontes, influenciando ante um predador, ao estímulo condicionado ao predador, e à dor, enquanto o núcleo central da amígdala influi mais no medo condicionado à dor. Ainda na amígdala, o basomedial posterior

integra informação de diferentes fontes provenientes do lateral e é mais relevante no medo não condicionado em resposta a um predador e nas pistas contextuais previamente pareadas com um predador. O medial da amígdala, por sua vez, leva mais informações olfatórias em caso de agressão com um coespecífico. O envolvimento de regiões de diferentes porções do hipotálamo, como o núcleo ventromedial e o núcleo pré-mamilar dorsal, além de uma região do mesencéfalo, a PAG, é algo comum aos diferentes medos (GROSS; CANTERAS, 2012; BINDI; BALDO; CANTERAS, 2018; MENDES-GOMES *et al.*, 2020).

A PAG tem influência muito conhecida na expressão de uma série de comportamentos motivados primordiais, como os de caça (COMOLI *et al.*, 2003; HAN *et al.*, 2017), reprodutivo, maternal (LONSTEIN; STERN, 1997; 1998) e de defesa (COMOLI *et al.*, 2003; CEZARIO *et al.*, 2008; GROSS *et al.*, 2012). Destaca-se também sua participação em processos nociceptivos (analgesia) (BESSON; FARDIN; OLIVÉRAS, 1991), autonômicos (LOVICK, 1993) e de vocalização (LARSON; KISTLER, 1984; GRUBER-DUJARDIN, 2010).

Com critérios neuroquímicos e comportamentais, a PAG pode ser parcelada em colunas funcionais distintas, a saber, dorsomedial (PAGdm), dorsolateral (PAGdl), lateral (PAGl) e ventrolateral (PAGvl) (BANDLER; SHIPLEY, 1994; BANDLER; KEAY, 1996; CARRIVE, 1993). Estudos mais recentes com estimulações de diversas modalidades nas colunas funcionais da PAG dão suporte a essa divisão. Na PAGdl, baixos níveis de estimulações elétricas promoveram respostas de congelamento, enquanto estímulos maiores promoveram respostas de fuga (VIANNA; LANDEIRA-FERNANDEZ; BRANDAO, 2001). Corroborando essas evidências, foi visto também que estimulações, como a optogenética da PAG dorsal (PAGdm e PAGdl), promovem comportamento de fuga mesmo na ausência de uma ameaça predatória (DENG; XIAO; WANG, 2016; KINCHESKI *et al.*, 2012). Tais resultados confirmam, por estimulação elétrica, farmacológica e optogenética, que a estimulação da PAG promove comportamento de fuga e congelamento motor na ausência de uma ameaça predatória (CARRIVE, 1993; BANDLER; KEAY, 1996; BITTENCOURT *et al.*, 2004; ASSAREH *et al.*, 2016; DENG; XIAO; WANG, 2016).

Cezario *et al.* (2008) mostraram que a PAG possui um padrão específico de atividade durante a exposição ao predador e ao contexto predatório. Os experimentos desse trabalho foram feitos com uma técnica comumente utilizada de marcação imuno-histoquímica da proteína FOS<sup>1</sup>. Ante a presença de um gato, o rato apresentou aumento da síntese da FOS na

---

<sup>1</sup> Proteína sintetizada por um gene chamado c-fos de expressão rápida usado como marcado indireto da atividade neural.

PAGdm e PAGdl no nível do núcleo oculomotor e no terço caudal da PAGl e PAGvl. Entretanto, durante a exposição ao contexto predatório, foi visto aumento da síntese da FOS na metade rostral da PAGdl e PAGdm, mas não na parte caudal da PAG.

Com base nos estudos mencionados, é possível detalhar a importância de cada coluna PAG nos comportamentos de medo inato e aprendido, e entender as diferenças ao longo do eixo rostrocaudal. Ademais, é possível especificar o papel de diferentes neurotransmissores nas respostas defensivas nessa região. Porém, há uma escassez de estudos que mostra o padrão de atividade neural por meio de registros eletrofisiológicos na PAG (DENG; XIAO; WANG, 2016; WATSON *et al.*, 2016; MASFERRER *et al.*, 2020). De particular interesse, nos estudos que exploram a atividade da PAG na interação predatória (DENG; XIAO; WANG, 2016; WATSON *et al.*, 2016; MASFERRER *et al.*, 2020; REIS *et al.*, 2021), os animais não foram expostos a predadores que provocam uma intensa reação de defesa, como por exemplo, um gato ou outro carnívoro (YANG *et al.*, 2004; RIBEIRO-BARBOSA *et al.*, 2005), e tão pouco foi estudada a atividade neuronal da PAG no contexto predatório. Até o momento, quatro estudos (DENG; XIAO; WANG, 2016; WATSON *et al.*, 2016; MASFERRER *et al.*, 2020; REIS *et al.*, 2021) observaram diretamente a atividade neural da PAG frente a um estímulo etologicamente relevante no medo, como por exemplo, quando um camundongo é exposto ao rato ou um rato é exposto a um papel com odor de um gato.

As informações sobre como é o padrão de atividade celular na PAG dorsal frente a diferentes níveis de ameaças ao predador ainda são insuficientes. DENG; XIAO; WANG (2016) registraram a atividade extracelular da PAG dorsal em camundongos apresentados a ratos. A definição comportamental de fuga no estudo foi feita com base no momento que o camundongo reage ao rato e se retrai em direção ao lado oposto à ameaça no aparato. A avaliação de risco foi definida como momento que precede a fuga. O animal foi exposto a três condições: um rato acordado, um anestesiado e um rato de brinquedo. Foram observados dois conjuntos de neurônios distintos, um se correlacionando positivamente com comportamentos de avaliação de risco (10% das células registradas) e outro com o comportamento de fuga (22% das células registradas). Entretanto, não foi comparada a atividade média entre as condições experimentais que o camundongo foi exposto (condições de exposição: rato, rato anestesiado e brinquedo).

Os neurônios tidos como de “avaliação de risco” apresentaram aumento na frequência de disparo logo antes do comportamento de fuga, aumentando gradativamente até o pico da atividade coincidir com o início da fuga. Sendo assim, essa célula pode ser de fato relacionada

à fuga e não com a avaliação de risco. Não pode ser excluída a hipótese de que a frequência de disparo da célula de fuga se correlacione com a aceleração do animal, pois os autores argumentam que não pode ser feito o controle da frequência de disparo pela aceleração por limitação metodológica. A atividade da célula de fuga também se correlaciona com a velocidade máxima do animal ao comparar a atividade celular e a velocidade máxima de cada experimento. Com isso, indica outra possibilidade de correlação (com índice da atividade motora do animal) que não seja o comportamento de fuga para as células intituladas de “fuga” (DENG; XIAO; WANG, 2016).

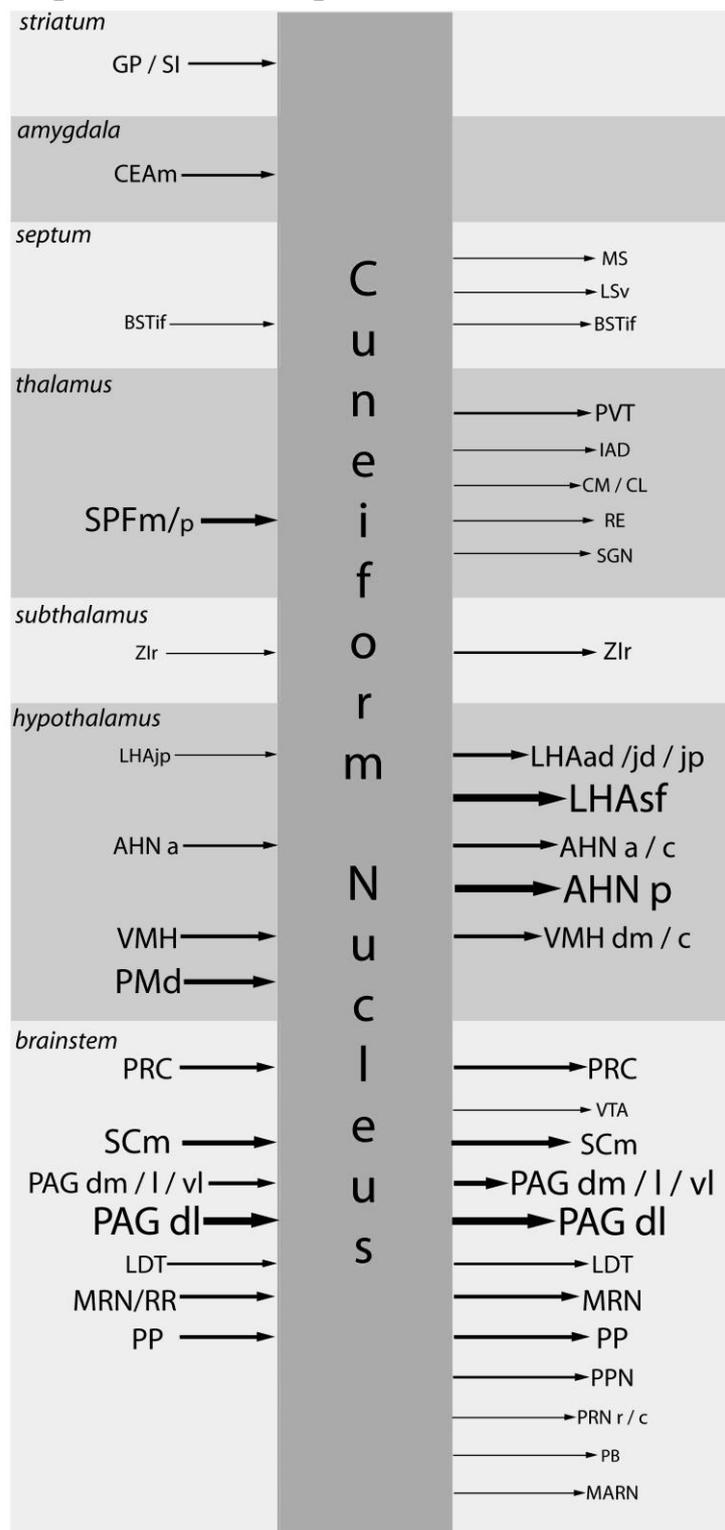
No trabalho realizado por Watson *et al.* (2016), foram feitos registros em ratos, tanto na PAG dorsal quanto na PAG ventral. Para evocar a emoção de medo, os autores usaram o odor do gato frente a um rato. Inicialmente, o rato ficou em sua caixa sem odor durante três minutos. Na sequência, foi introduzido um papel impregnado com odor do gato pelo mesmo período. Diferente do estudo de DENG; XIAO; WANG (2016), não foram encontradas correlações da atividade celular com comportamento do animal. Observou-se que 63% das células registradas na PAG dorsal tiveram um aumento de atividade durante a exposição ao odor de gato, enquanto 37% não apresentaram aumento. Já na PAG ventral, o aumento da atividade foi menor e mais limitado à parte inicial da exposição, com metade das células respondendo ao odor e outra metade sem alteração. Com uma abordagem similar, Masferrer *et al.* (2020) obtiveram resultados parecidos e sugeriram duas classes de neurônios da PAG dorsal: um grupo que modula a atividade conforme o animal se aproxima do predador (células de avaliação de risco) e outro cuja atividade era afetada quando o rato executava fuga (células de fuga).

Estudos como os de DENG; XIAO; WANG (2016), Watson *et al.* (2016), Masferrer *et al.* (2020) e Reis *et al.* (2021) utilizaram implantes cerebrais profundos crônicos em animais que se comportavam livremente. As informações aversivas apresentadas aos ratos, nesses estudos, e as respostas comportamentais, contudo, são mais tênues quando comparadas com a apresentação de um gato para um rato (RIBEIRO-BARBOSA *et al.*, 2005), como foi o caso dos resultados do artigo I desta pesquisa. Também não foram estudadas as alterações das atividades celulares nos ratos durante o contexto predatório. Evidenciamos que a PAG dorsal é um sítio crítico para codificar diferentes níveis de ameaça predatória, e que a atividade dos neurônios registrados tem mais relação com estado ambiente que o animal é exposto e o estado emocional que o comportamento específico (BINDI *et al.*, 2022). Como mencionado, a relação da PAG com o CUN é importante para explicar as respostas comportamentais envolvidas no medo.

## 1.2 NÚCLEO CUNEIFORME

O CUN é uma estrutura mesencefálica situada lateralmente à parte caudal da PAG e inferiormente ao colículo superior (CS). As conexões descritas no Artigo II confirmam e abrangem estudos prévios de projeções retrógradas (ZEMLAN; BEHBEHANI, 1984), enquanto as principais conexões de entradas para o CUN são ratificadas nos estudos prévios de rastreamento. Incluindo o núcleo subparafascicular (YASUI; NAKANO; MIZUNO, 1992), o núcleo anterior hipotalâmico (RISOLD; CANTERAS; SWANSON, 1994), o núcleo ventromedial hipotalâmico (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1994) e o núcleo premamilar dorsal (CANTERAS; SWANSON, 1992), o núcleo precomissural (CANTERAS; GOTO, 1999a), as camadas intermediárias e profundas da parte medial do colículo superior (FURIGO *et al.*, 2010), a PAG (CAMERON *et al.*, 1995) e a área peripeduncular (ARNAULT; ROGER, 1987) (Figura 1).

**Figura 1** – Esquema das projeções do cuneiforme usando dois traçadores diferentes: um retrógrado e outro anterógrado



Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Os resultados eferentes foram observados após o uso do rastreamento anterógrado com *Phaseolus vulgaris*. As aferências foram analisadas após o uso do Fluorogold como traçador retrógrado.

A PAG dorsal e o CUN fazem parte do circuito que regula a resposta cardiovascular associada à resposta de defesa em ratos (REDGRAVE; DEAN, 1991; LOVICK, 1993; VERBERNE, 1995; WALKER; WINN, 2007; NETZER *et al.*, 2011; FARROKHI *et al.*, 2017; NETZER; SÉVOZ-COUCHE, 2021). Ademais, a ativação do CUN induz aumento na expressão da proteína FOS na PAG dorsolateral (NETZER *et al.*, 2011). Estudos com a expressão dessa proteína mostraram aumento na atividade do cuneiforme em roedores durante a exposição ao gato (CANTERAS; GOTO, 1999b) ou ao seu cheiro (MCGREGOR *et al.*, 2004). Além disso, também foi descrito um aumento da expressão da imunorreatividade à proteína FOS no núcleo cuneiforme diante de estímulos nociceptivos (LANTE *et al.*, 1994).

Conforme ilustrado na Figura 1, o Laboratório de Neuroanatomia Funcional do Departamento de Anatomia (USP)<sup>2</sup> mostrou que o CUN recebe projeções do núcleo hipotalâmico anterior, do núcleo ventromedial e do núcleo pré-mamilar dorsal bem como da PAGdl, um dos principais alvos do circuito hipotalâmico de defesa (GROSS; CANTERAS, 2012). Ademais, o núcleo cuneiforme recebe projeções substanciais da parte medial das camadas profundas do colículo superior, da região peripeduncular e da parte magnocelular do núcleo subparafascicular do tálamo.

Redgrave e Dean (1991) descreveram previamente as projeções para o núcleo cuneiforme, oriundas das camadas profundas da parte medial do CS, região que responde a *looming shadows*, que mimetizam a aproximação de ameaças, aproximando-se pelo campo visual superior, como poderia ser esperado num ataque predatório (REDGRAVE; DEAN, 1991). Além disso, as porções mediais do CS integram informações do circuito hipotalâmico de defesa (GROSS; CANTERAS, 2012) bem como informações nociceptivas e auditivas (YASUI; NAKANO; MIZUNO, 1992). Estudos funcionais (BITTENCOURT *et al.*, 2004) revelam que estimulação elétrica e química das porções profundas da parte medial do CS evoca fuga e congelamento. Sendo assim, muitas projeções do CUN estão em posição privilegiada para processar informação relacionada a eventos que ameaçam a sobrevivência.

Apesar desses achados, pesquisas recentes estudaram o papel do núcleo cuneiforme em camundongos como modelo para Parkinson (FOUGÈRE *et al.*, 2021; VAN DER ZOUWEN *et al.*, 2021) e até em humanos com Parkinson (BOURILHON *et al.*, 2022) com a expectativa de

---

<sup>2</sup> Mais informações em: <https://ww3.icb.usp.br/newton-sabino-canteras/>

melhorar o comportamento motor por meio de estimulação na região. Tais estudos decorrem de o núcleo cuneiforme inicialmente ter sido relacionado com a região locomotora mesencefálica (SHIK; SEVERIN; ORLOVSKY, 1966; COLES; ILES; NICOLOPOULOS-STOURNARAS, 1989). Na época, foi avanço para o entendimento das bases neurais para iniciação de locomoção, a descoberta se deu pela estimulação do mesencéfalo, que promovia locomoção em gatos descerebrados (SHIK; SEVERIN; ORLOVSKY, 1966). Segundo Shik, Severin e Orlovsky (1966 apud JORDAN, 1998, p. 83):

O gato que antes da estimulação estava imóvel e de repente “veio a vida”, levantou-se sobre as pernas e começou a se mover, pondo-se em movimento ou acelerando a esteira... É assumido que esse controle no andar e corrida se dá por meio da mudança na excitabilidade de uma região definida do mesencéfalo (tradução nossa).

A área estimulada no trabalho de Shik, Severin e Orlovsky (1966) ficou conhecida como locomotora mesencefálica. Os autores foram os primeiros a implicar especificamente uma região semelhante ao CUN e núcleo pedunculopontino na locomoção. Como o circuito responsável por essa via locomotora levou a resultados conflitantes, mudanças no modelo passaram a ser propostas com certa frequência. Uma visão mais atual dessa área implica locomoção em decorrência das atividades dos núcleos, que são diversas a depender de seus contextos comportamentais. Assim, certas áreas podem estar associadas com locomoção em um contexto exploratório, apetitivo e defensivo, como foi inicialmente proposto por Sinnamon (1993).

A partir dessa perspectiva, Sinnamon (1993) argumentava que os estudos de lesão e atividade de proteína FOS devem ser interpretados frente às tarefas e aos estímulos apresentados. Tal visão difere do entendimento inicial da região locomotora mesencefálica. Um dos circuitos propostos envolve os núcleos da base (accumbens via pálido ventral e substância negra via neoestriado), que modulam neurônios da região locomotora mesencefálica (MLR) do sistema exploratório (via zona incerta), enquanto uma via do hipotálamo medial e substância cinzenta periaquedutal (PAG) afeta o sistema defensivo (via CUN) (SINNAMON, 1993; JORDAN, 1998). Sinnamon (1993) também defendiam que a locomoção servia para aumentar a distância de estímulos ameaçadores e reduzir a distância de estímulos apetitivos, no caso da exploração, a locomoção era direcionada a estímulos distais que caracterizam o ambiente. Assim, esses estudos já indicavam que o papel da locomoção do CUN não poderia ser considerado sem entender a relação dele com a PAG, tampouco fora de um estado relacionado ao medo. Na época já se sabia que injeções de glutamato no CUN resultam em andar, fugir,

saltar e no congelamento motor (MITCHELL; DEAN; REDGRAVE, 1988; MITCHELL; REDGRAVE; DEAN, 1988).

Todavia, lesões bilaterais sugerem que o núcleo não está envolvido na mediação de locomoção espontânea ou induzido pelo núcleo *accumbens*, tornando o núcleo cuneiforme um candidato improvável como parte de um substrato anatômico para a região locomotora mesencefálica (ALLEN; INGLIS; WINN, 1996). Essas pesquisas sobre o papel CUN relacionado ao medo e à sua improvável relação com a mediação de locomoção espontânea evocam ao problema desses estudos em camundongos como modelo para Parkinson. Neles, os animais que receberam estimulações optogénicas no núcleo cuneiforme tiveram um aumento de velocidade significativamente maior do que o observado em qualquer período do camundongo controle (sem lesão e sem estimulação). A velocidade observada nos camundongos chegaram a ser superior a 20 cm/s e um dos roedores chegou a alcançar cerca de 60 cm/s (FOUGÈRE *et al.*, 2021; VAN DER ZOUWEN *et al.*, 2021). Tipicamente, velocidades acima de 20 cm/s podem ser consideradas comportamentos de fuga. Os estudos não mencionavam observações etológicas dos animais, tampouco falavam sobre a possibilidade de os animais estarem executando comportamentos defensivos (DE FRANCESCHI *et al.*, 2016).

Em síntese, de acordo com Bourilhon *et al.* (2022), os animais participantes desses estudos poderiam realizar comportamento de fuga, não apresentando uma melhora motora direta. A pesquisa não mencionou essa hipótese alternativa. Considerou apenas que a intervenção representava uma melhora motora. O estudo com humanos realizou estimulação cerebral profunda na tentativa de melhorar a locomoção em pacientes com Parkinson ao comparar o andar em pacientes com estimulações no cuneiforme, na região pedúnculo pontinha, e um grupo controle. Não foram observadas melhoras posturais no caminhar e, após dois meses de estimulação nas regiões estudadas, os pacientes não melhoraram clinicamente as desordens relacionadas ao desbalanço no caminhar em pacientes com Parkinson. Também foi visto que desordens no balanço e na caminhada pioraram nos grupos que receberam estimulações no núcleo cuneiforme em dois anos (BOURILHON *et al.*, 2022).

Os experimentos em humanos poderiam ser evitados, pois se basearam em achados que desconsideraram o contexto etológico e não cogitaram experimentos que questionam a participação do núcleo como parte da região mesencefálica locomotora, como nos experimentos de lesão excitotóxicas do CUN na locomoção espontânea e induzida pelo núcleo *accumbens* (ALLEN; INGLIS; WINN, 1996), tampouco os estudos a serem mencionados. Evitar tratamentos iatrogênicos já seria uma motivação para realizar este trabalho, mas a literatura

sobre pesquisa de base, referente à função e anatomia do CUN, ainda é incipiente. Alguns argumentos apresentados já seriam suficientes para evocar mais cautela, mas ainda não sabemos o que poderia questionar a validade de tais ensaios clínicos em humanos.

Estudos mostraram que o núcleo cuneiforme pode modular as respostas simpáticas. O núcleo cuneiforme é simpático-excitatório, pois controla as respostas defensivas vegetativas por meio de forte modulação do sistema simpático (REDGRAVE; DEAN, 1991; VERBERNE, 1995; WALKER; WINN, 2007; NETZER *et al.*, 2011; FARROKHI *et al.*, 2017; NETZER; SÉVOZ-COUCHE, 2021). Especificamente foi observado envolvimento na regulação cardiovascular central, mas não envolvida na regulação basal do tônus cardiovascular (SHAFEI *et al.*, 2012). Corroborando o papel do núcleo cuneiforme na ativação do sistema simpático, Verbene *et al.* (1995) observaram que a estimulação elétrica do núcleo cuneiforme produz aumento da pressão arterial dependente da intensidade da estimulação. Recentemente o mecanismo do controle do CUN no barorreflexo foi visto e inibido durante uma reação de defesa ante um estressor gerador de medo agudo (NETZER; SÉVOZ-COUCHE, 2021). Nesse estudo foi mostrado que a desinibição do núcleo cuneiforme induz uma ativação de neurônios 5-HT da região intermediária rostro-ventromedial do bulbo, e a liberação de 5-HT afeta os receptores do núcleo do trato solitário, inibindo o barorreflexo.

Em resumo, existem dois grandes ramos de pesquisa sobre o núcleo cuneiforme. Um deles estuda o barorreflexo e como o cuneiforme controla respostas do mesencéfalo-medular. O outro avalia como o cuneiforme controla os movimentos locomotores em um modelo de rato, sendo explorado à luz de doenças como o Parkinson. Devido às suas conexões e localização no cérebro, também foram propostos e estudados seus efeitos nas respostas de medo (SINNAMON, 1993).

O núcleo peripeduncular está inserido na circuitaria do núcleo cuneiforme, compartilhando diversas de suas conexões. Assim, à semelhança do núcleo cuneiforme, o núcleo peripeduncular recebe projeções do núcleo subparafascicular do tálamo e projeta-se para o colículo superior, bem como estabelece conexões bidirecionais para a parte dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal para o núcleo ventromedial do hipotálamo e para o núcleo cuneiforme (ARNAULT; ROGER, 1987). Todavia, em contraste ao núcleo cuneiforme, o núcleo peripeduncular recebe projeções do colículo inferior e, dessa forma, adiciona ao circuito do núcleo cuneiforme informações auditivas.

A parte magnocelular do núcleo parafascicular, no que lhe concerne, integra informações auditivas e nociceptivas (MORIIZUMI; HATTORI, 1992; YASUI; NAKANO;

MIZUNO, 1992). Nesse sentido, cabe ressaltar que, após um estímulo nociceptivo e auditivo de alta intensidade, observa-se uma maior marcação de neurônios com expressão de proteína FOS no núcleo subparafascicular (LIU; QIANG; QIAO, 1998; PALKOVITS *et al.*, 2004). Em outras palavras, o núcleo cuneiforme integra uma gama de informações que podem estar relacionadas a uma ameaça predatória, tais como informações processadas pelo circuito hipotalâmico de defesa e informações de *looming shadows* do campo visual superior, mimetizando aproximações de predadores, bem como informações nociceptivas e auditivas. Considerando as eferências, cabe ressaltar que o CUN se projeta de volta para elementos do circuito hipotalâmico de defesa (tais como o núcleo hipotalâmico anterior, a região subfornicial do hipotálamo lateral e a parte dorsomedial do núcleo ventromedial) e para a PAGdl, seu principal alvo de projeção. A estimulação elétrica ou optogenética da PAGdl evoca comportamento de congelamento motor ou de fuga (DENG; XIAO; WANG, 2016).

Considerando as relações hodológicas do núcleo cuneiforme, tem-se que essa região deve estar intimamente relacionada à organização de comportamentos de defesa em situações de ameaça predatória. Como existem poucas informações funcionais desse núcleo, nesta pesquisa, propõe-se um estudo funcional do núcleo cuneiforme com técnicas de estimulação optogenética e inibição farmacológica, assim como um estudo eletrofisiológico para avaliar como sua ativação se correlaciona aos

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Identificar o papel do núcleo cuneiforme no contexto de dois comportamentos antagônicos: o de caça predatória e o de defesa antipredatória. Assim, além de ser possível avaliar o papel do núcleo no comportamento de defesa, também será analisado como o núcleo cuneiforme influencia a caça predatória (artigo II).
- Identificar e contrastar a relação da atividade dos neurônios registrados na PAG com os comportamentos diante de diferentes níveis de ameaça predatória (artigo I).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar atividade elétrica da PAG dorsal:  
Estudar a relação da atividade elétrica da PAG dorsal no rato diante de diferentes níveis de ameaça predatória, ou seja, durante a exposição a um predador natural (o gato) e ao ambiente sem o gato minutos após retirá-lo (ainda com odor), e durante o contexto predatório (Artigo I).
- Estudar o ganho de função Cuneiforme:  
Utilizar a técnica de estimulação optogenética a fim de observar o efeito da estimulação do cuneiforme em um animal que caça livremente e notar a mudança no padrão comportamental, além de avaliar a influência do núcleo na formação de memória aversiva ao contexto. No dia seguinte após estimulação do núcleo, foi observado se existe reação de defesa ao contexto em que ocorreu a estimulação (Artigo II).
- Estudar a perda de função Cuneiforme:  
Observar o efeito da inibição do núcleo no comportamento de caça, no comportamento antipredatório, durante a exposição ao predador e durante o contexto predatório (Artigo II).
- Entender as conexões do núcleo Cuneiforme:  
Observar e contextualizar as projeções obtidas por traçadores anterógrados (*Phaseolus vulgaris* — PHA-L) e retrógrados (*Fluorogold*) colocados no núcleo cuneiforme e contrastar com a literatura científica das regiões observadas (Artigo II).

### 3 ARTIGOS: RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 ARTIGO I: NEURAL CORRELATES OF DISTINCT LEVELS OF PREDATORY THREAT IN DORSAL PERIAQUEDUCTAL GRAY NEURONS<sup>3</sup>

A PAG tem um papel fundamental na modulação e integração de informações sensoriais, como analgesia (BESSION; FARDIN; OLIVÉRAS, 1991), vocalização (LARSON; KISTLER, 1984; GRUBER-DUJARDIN, 2010), visual (REDGRAVE; DEAN, 1991) e emoção de medo e comportamentos defensivos (CEZARIO *et al.*, 2008; GROSS; CANTERAS, 2012; DENG; XIAO; WANG, 2016; WATSON *et al.*, 2016; MASFERRER *et al.*, 2020; REIS *et al.*, 2021) ante ameaça predatória.

Poucos estudos foram feitos para elucidar o papel do PAG dorsal com registros eletrofisiológicos (DENG; XIAO; WANG, 2016; WATSON *et al.*, 2016; MASFERRER *et al.*, 2020). Este foi o primeiro estudo que relaciona a atividade desse núcleo diante dos diferentes níveis de ameaça predatória, enquanto comparava a atividade em comportamentos diferentes. Com isso, elucidada a importância relativa dessa região na codificação de informação do estado emocional e no comportamento, questão previamente não observada.

Para começar a elucidar os correlatos neurais na PAG dorsal em diferentes níveis de ameaça, oito ratos foram colocados em um desenho experimental com o propósito de trazer informações sobre a atividade de 41 neurônios registrados. Para a realização do estudo foi necessária a implementação da técnica de eletrofisiologia no laboratório, a partir da utilização do Sistema Axona, bem como a criação de programas no Matlab para a realização do processamento dos dados das atividades neurais registradas. Ao utilizar ferramentas desenvolvidas neste doutorado e durante o mestrado, foi possível estudar a região e obter evidências de que os neurônios registrados nela se relacionam a diferentes níveis de ameaça predatória, mais do que especificamente comportamentos distintos orientados por ela. Assim, o papel da PAG dorsal parece ser mais de codificar informações do estado emocional do animal.

Com os oito ratos utilizados (unidade experimental) e 41 células estudadas foi possível obter resultados significativos tanto para as mudanças dos grupos de células de um animal quanto para mudanças entre os animais. Esse problema é muito prevalente em estudos biológicos. Em experimentos animais realizados entre 2011 e 2016, apenas 22% dos estudos replicaram as entidades corretas para produzir inferências estatísticas válidas. O problema de

---

<sup>3</sup> Este artigo está publicado em: 10.1111/ejn.15633 (BINDI *et al.*, 2022).

pseudoreplicação infla artificialmente o tamanho da amostra e as conclusões científicas, aumentando os falsos positivos. No caso desta pesquisa, para análise eletrofisiológica, a unidade experimental é o rato, pois as células têm influência mútua (LAZIC; CLARKE-WILLIAMS; MUNAFÒ, 2018).

Nos experimentos, foram registrados ratos com diferentes condições experimentais que induziram diferentes comportamentos, indicando uma mudança no estado emocional subjacente. A progressão do estímulo seguiu cinco condições: habituação, estímulo novo (animal de pelúcia com odor de baunilha), estímulo ameaçador (gato vivo), remoção recente de ameaças (pós-gato) e ambiente vazio e limpo após exposição à ameaça (contexto). Essas condições são detalhadas na seção Materiais e Métodos no artigo I. Durante cada uma dessas condições, os animais apresentaram um conjunto diferente de comportamentos, variando sua duração. Comportamentos semelhantes foram executados durante a habituação e exposição a um animal de pelúcia, quando os animais exploravam o ambiente ou realizavam outros comportamentos não categorizados, como higiene e descanso. Como esperado, um conjunto diferente de comportamentos foi executado durante a exposição do gato e a condição pós-gato, alternando entre o congelamento e as respostas defensivas. Por fim, durante a condição de contexto, os ratos apresentaram um repertório comportamental mais diversificado, alternando entre todas as categorias de comportamentos classificados.

### 3.1.1 O padrão comportamental ou a condição que o animal está exposto; quem tem maior impacto na atividade relativa?

Para começar a responder a essa pergunta a atividade de neurônios da PAG dorsal com tetrodos foi registrada, além da atividade dos neurônios das unidades experimentais (os ratos) associadas à classificação temporalmente definida dos comportamentos individuais em diferentes níveis de ameaça. Em seguida, foi observada a frequência relativa de disparo (frequência de disparo durante comportamento de interesse dividida pela frequência durante outros comportamentos não categorizados tipicamente descanso) dos 41 neurônios. Essas medidas foram feitas durante a expressão dos comportamentos de congelamento motor, avaliação de risco e exploração enquanto os animais estavam expostos a cinco condições consecutivas (habituação, pelúcia, gato, momento após o gato e contexto).

Antes da análise estatística, foram feitas as médias das frequências relativas dos neurônios (unidade observacional) para cada um dos oito ratos (unidade experimental). Diante

dos resultados, obteve-se uma observação para cada combinação de fator por rato (média da frequência relativa expressada como média  $\pm$  erro padrão). Com uma análise 3x5 de variância de medidas repetidas de duas vias, os fatores de comportamento e condição foram comparados. Também foi feita uma correção de Holm-Bonferroni para as comparações post-hoc a fim de manter o nível de significância global em 0,05 (valor-p corrigido). Foram obtidas diferenças significativas apenas para o fator condição ( $F_{4,28} = 7,931$ ;  $p = 2 \times 10^{-4}$ ;  $h^2 = 0,336$ ), sem efeito para o fator comportamento ( $F_{4,14} = 2,538$ ;  $p = 0,115$ ;  $h^2 = 0,016$ ), tampouco foi observada interação entre os dois fatores ( $F_{8,56} = 1,291$ ;  $p = 0,267$ ;  $h^2 = 0,047$ ). Quando a frequência relativa média foi tirada sobre o fator condição, o teste Holm-Bonferroni não mostrou nenhuma diferença significativa. Quando a média foi feita sobre os comportamentos, a condição gato apresentou maior atividade relativa, mostrando diferença significativa de todas outras condições ( $10^{-3} < p < 0,031$ ). Tais resultados trazem evidências sobre a ideia de que a condição teve um maior impacto na frequência média relativa de disparo em comparação aos comportamentos.

### 3.1.2 Quais são os melhores preditores das frequências de disparo nos neurônios observados: a condição experimental ou o comportamento?

Para esta pergunta foi utilizado um modelo de regressão generalizada (GLM). Em uma regressão linear múltipla, os fatores usados para prever determinada variável (por exemplo, a atividade de um neurônio), não permite que a relação seja não linear (uma relação exponencial ou de Poisson, por exemplo). Por esse motivo, como vimos que o padrão de atividade celular se aproxima mais de uma distribuição de Poisson e o disparo foi classificado como presente ou ausente em um determinado intervalo de 1 ms, foi usado um GLM de Poisson (KRAMER; EDEN, 2016). Tal modelo permite que mudanças nas variáveis afetem os valores preditos de forma não linear, no qual podem ser usados diferentes fatores simultaneamente para melhor prever a atividade dos neurônios registrados. Portanto, é possível abordar como a atividade neuronal individual se relaciona mesmo com variáveis categóricas (o animal está ou não em determinada condição, ou realizando determinado comportamento, formando dez fatores).

Sendo assim, a condição experimental e o comportamento podem ser considerados simultaneamente para explicar a atividade de cada neurônio registrado. Ao adotar essa abordagem, busca-se isolar a relação entre mudanças ambientais e comportamentais. Com todos os dez fatores preditivos inclusos – seis ligados a momentos antes e após cada comportamento

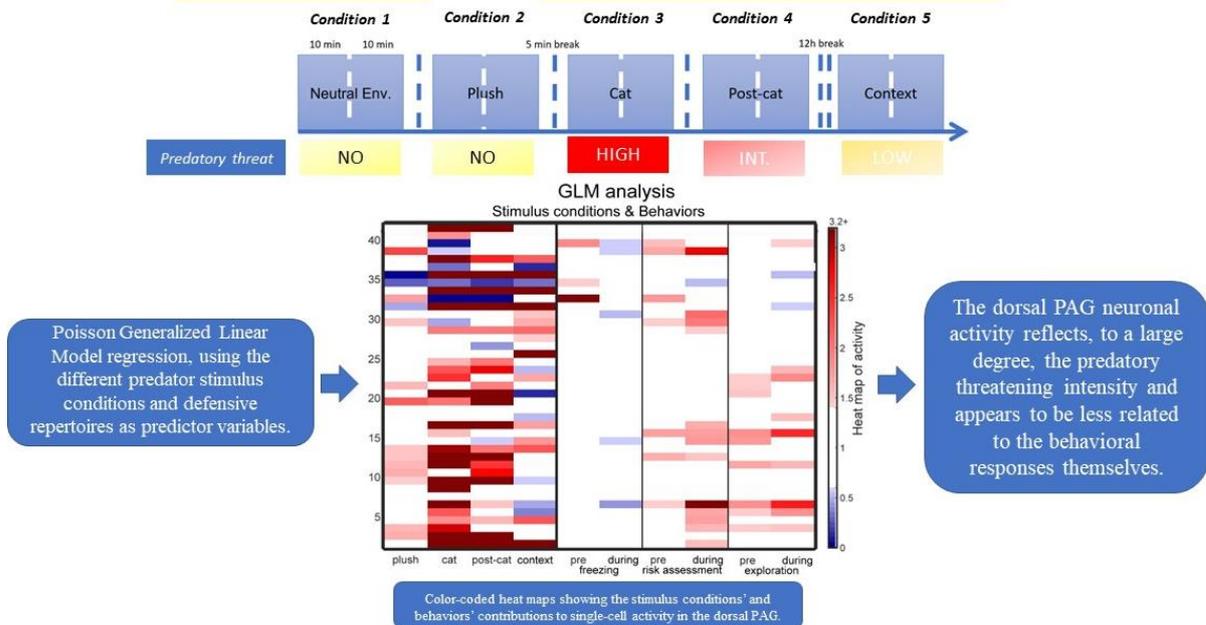
e quatro indicando cada condição –, foi verificada uma influência prevista mais forte do fator ambiental em comparação com os fatores comportamentais.

A atividade celular aumentou em 61% células durante a exposição do gato, 51% após a remoção do gato e 37% durante a exposição ao contexto no dia seguinte. Por outro lado, foram muito menos comuns as porcentagens de células com atividade reduzida durante a exposição do gato (15%), pós-gato (10%) e contexto (20%). Para essas três condições, apenas uma minoria de células não alterou sua taxa de disparo. O oposto foi verdadeiro para a condição de pelúcia, com atividade aumentada em 29% das células, diminuída em 7% e inalterada em 63% delas. O fator com maior influência no aumento da atividade foi a exposição ao gato vivo (aumento de 6,5 vezes em relação ao basal em média), em seguida a condição posterior ao gato (aumento de 4 vezes) e, por fim, o contexto com aumento de cerca de três vezes. Nenhum fator comportamental previu aumento em mais de 32% das células observadas (caso da avaliação de risco) e de 66% até 93% das células o fator comportamental não previa alteração, e o maior aumento médio de um fator comportamental foi equiparável ao do fator da condição pelúcia (cerca de duas vezes).

O resultado do GLM pode ser visto no abstract apresentado na Figura 2. Tanto as porcentagens de células quanto os aumentos médios previstos apresentam um gradiente de proporcional com o nível de ameaça e uma relação mais fraca com comportamento, tanto em aumento relativo quanto em porcentagem de células.

**Figura 2** – Desenho experimental na parte superior da imagem, com níveis de ameaça predatória e cada uma das condições que os ratos foram registrados (resumo gráfico do artigo I)

## Neural correlates of distinct levels of predatory threat in dorsal periaqueductal gray neurons.



Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Este trabalho corrobora com a literatura ao observar a atividade elétrica dos neurônios da PAG dorsal frente a níveis de ameaça diferentes enquanto o rato executa comportamentos diversos. Comparando a influência do comportamento e das condições na atividade neural. O modelo GLM de Poisson e as comparações 3x5 de variância de medidas repetidas de duas vias utilizadas neste artigo delimitam as unidades experimentais e observacionais. A partir dessas análises foi possível perceber que vários fatores eram comparados conjuntamente, fornecendo, assim, uma ferramenta para entender a influência relativa destes fatores e melhorando o entendimento da influência do estado emocional no padrão da atividade observada na PAG dorsal.

### 3.2 ARTIGO II: ANATOMICAL AND FUNCTIONAL STUDY OF THE CUNEIFORM NUCLEUS

O estudo apresentado no artigo II analisou tanto as projeções (aférentes e eférentes) do núcleo cuneiforme quanto os aspectos funcionais, observando o comportamento ante a estimulação e inibição do núcleo. Quanto à investigação das projeções, observou-se que o CUN faz parte do circuito de defesa, com muitas projeções em comum com outra estrutura mesencefálica estudada no artigo I (PAG dorsal). Particularmente, referente às aferências, muitas projeções de regiões diretamente envolvidas no processamento da informação de eventos relacionado a uma predação foram observadas.

O estudo fornece evidências que indicam que o CUN seja um componente caudal da PAG. O CUN possui uma relação bidirecional forte com a PAG dorsolateral. Ademais, o CUN e a PAG dorsolateral possuem um conjunto similar de fontes de informação que processam eventos que ameaçam a vida. Além disso, o CUN projeta para regiões que influenciam comportamentos de defesas contra predadores. Muitas projeções aferentes do CUN estão envolvidas no processamento de ameaça predatória, incluindo a parte dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico, o núcleo premamilar dorsal, além de diversas regiões da PAG (particularmente PAG dorsolateral) e de partes mediais das camadas intermediárias e profundas do colículo superior. A parte dorsomedial do núcleo ventromedial hipotalâmico responde às ameaças predatórias a partir de informações amigdalares predatória, tanto a partir de pistas olfatórias quanto não olfatórias (GROSS; CANTERAS, 2012).

A projeção vista da região do núcleo premamilar dorsal foi justamente a parte mais responsiva a um predador (CEZARIO *et al.*, 2008). O padrão visto na PAG é ainda mais revelador e as regiões marcadas com *Fluorogold* nos animais estudados no artigo II tiveram um padrão similar às células marcadas com FOS em experimentos de outros artigos em que animais foram expostos a um predador vivo (COMOLI; RIBEIRO-BARBOSA; CANTERAS, 2003). Além do CUN possuir aferências de todas essas regiões ativas na defesa antipredatória, ele é um importante alvo do núcleo subparafascicular do tálamo, que responde a estímulos dolorosos (LIU; QIANG; QIAO, 1998). Sendo assim, o CUN possui vias redundantes com a PAG de forma direta ou mediada pela PAG dorsolateral para áreas associadas a ameaças predatórias. Este estudo também mostrou que o CUN recebe informação do núcleo central da amígdala, conhecido por participar em respostas condicionadas aversivas, caça e respostas autonômicas (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015; HAN *et al.*, 2017; OLSEN; FURLONG; CARRIVE,

2021). Provavelmente é por meio das relações com o central da amígdala que o CUN pode interagir e influenciar o controle simpático vasomotor em uma resposta defensiva (VERBERNE, 1995). Essas regiões descritas levam informação para o CUN e estão intimamente associadas aos circuitos de defesa.

Observadas as eferências do CUN, ele também se projeta e influencia o circuito que medeia a resposta antipredatória. O CUN se projeta para regiões na PAG responsivas ao predador vivo, como por exemplo, o dorsomedial, dorsolateral e ventral (CEZARIO *et al.*, 2008). As projeções para PAG dorsolateral são particularmente densas e confirmadas em estudos retrógrados prévios (BEITZ, 1989). Além das projeções diretas para a PAG dorsolateral, o CUN também possui fortes projeções para diversos sítios que se projetam para PAG dorsolateral. Sendo assim, o núcleo CUN possui rotas diretas e indiretas para os núcleos dorsomedial ventromedial hipotalâmico (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1994), pré-comissural (CANTERAS; GOTO, 1999a), camadas profundas e intermediárias do colículo superior (FURIGO *et al.*, 2010) e a parte lateral da região mesencefálica reticular (BEITZ, 1989) e área peripeduncular (ARNAULT; ROGER, 1987). O estudo anterógrado mostra projeções em comum com as regiões descritas nas aferências associadas na defesa predatória, em particular as regiões mesencefálica e hipotalâmicas.

O resultado também revela que o CUN se projeta para diversos núcleos talâmicos, sendo particularmente marcada a parte anterior do núcleo paraventricular. Essa região é ativada em condições que produzem alerta, incluindo em casos de valência emocional negativa. A parte anterior do núcleo paraventricular está implicada nos circuitos que mediam o comportamento de defesa (KIROUAC, 2015).

As projeções descendentes do CUN para ponte e medula são menores em relação às projeções ascendentes para as regiões mesencefálica e prosencefálicas. Na ponte foram vistas projeções no núcleo reticular da ponte (rostral e caudal), além de um campo terminal claro no núcleo pedúnculo-pontino (parte importante do circuito ligado à atenção) (KOZAK *et al.*, 2005).

Referente aos aspectos funcionais, o estudo observou que a estimulação optogenética do núcleo promoveu uma rápida mudança no padrão comportamental do rato. Sob estimulação, os ratos imediatamente cessavam o comportamento de caça ao grilo e começavam um congelamento motor e posteriormente comportamento de fuga. Não foram observadas mudanças relacionadas à memória do processo de estimulação, ou seja, não foram vistas diferenças entre o dia anterior e o dia posterior à estimulação optogenética. A inibição

farmacológica com muscimol do núcleo também não evidenciou alteração na memória, pois não foi possível observar mudanças comportamentais no rato frente ao ambiente que ele previamente encontrou um gato. Porém, a inibição do CUN com muscimol provocou nos ratos uma redução no congelamento motor frente a um estímulo predatório, sem causar mudanças significativas em outros parâmetros. No experimento de estimulação optogenética durante a caça, no segundo dia, a resposta comportamental dos ratos foi observada e contrastada enquanto estimulava o núcleo cuneiforme unilateralmente e quando o rato não recebia estimulação.

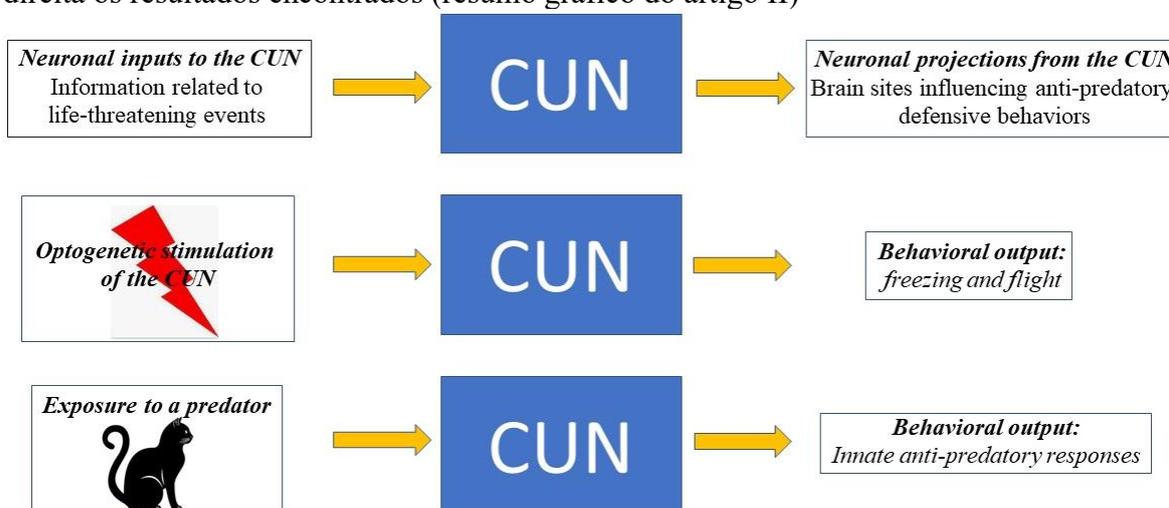
Durante a estimulação, os animais diminuíram significativamente o comportamento exploratório e alimentar (classificação sinalizada de Wilcoxon,  $p < 0,004$ ,  $n = 9$  ratos). Ao mesmo tempo, observou-se um aumento acentuado no congelamento e fuga (posição sinalizada de Wilcoxon,  $p < 0,004$ ,  $n = 9$  ratos) sem significância estatística ao comparar o comportamento de avaliação de risco. A variável “resposta” agrega todas as variáveis em uma. Valores negativos indicam comportamentos predominantemente defensivos e valores positivos indicam primariamente exploratório e forrageiro. Os valores de resposta foram abaixo de 200s negativos com estimulação, aumentando para valores acima de 200s positivos na presença de estimulação (classificação sinalizada de Wilcoxon,  $p < 0,004$ ,  $n = 9$  ratos). Não foram observadas diferenças ao comparar o dia anterior e posterior à estimulação em todos os comportamentos. A variável resposta teve a maior diferença estatística (classificação sinalizada de Wilcoxon,  $p = 0,069$ ,  $n = 9$ ), enquanto comer, explorar e avaliar o risco foram todos acima de  $p > 0,1$ . Além disso, os ratos não expressaram comportamento de congelamento ou fuga no primeiro ou terceiro dia. Portanto, não há evidências de formação de memória induzida pela estimulação optogenética.

No experimento de inibição farmacológica com muscimol em uma parte exploratória do experimento, foram observados dois grupos de ratos em dois dias diferentes. O grupo controle recebeu solução salina no segundo dia (dia da injeção) e o grupo experimental recebeu muscimol. O tempo foi observado em segundos gastos comendo, explorando, avaliando riscos, realizando outros comportamentos e o tempo que cada rato levou para começar a comer o grilo (Latência). A análise não demonstrou alterações intraindivíduo ( $F(1,18) < 4,4$ ,  $p > 0,05$ ,  $\eta^2 < 0,06$ ,  $n = 20$ ), e o animal passou a maior parte do tempo explorando ou comendo. A maior mudança foi observada na latência, e ainda não foi estatisticamente significativa, sem efeito entre sujeitos ( $F(1,18) = 2,9$ ,  $p = 0,1$ ,  $\eta^2 = 0,077$ ,  $n = 20$ ). Esse experimento exploratório foi incapaz de mostrar quaisquer descobertas significativas.

Na segunda parte do experimento, o tempo médio de realização de congelamento ou comportamentos de avaliação de risco durante a exposição ao gato ou ao contexto foi observado

ao comparar os grupos de solução salina e muscimol. Ao analisar o comportamento de congelamento, notou-se uma interação significativa de três vias ( $F(1,18) = 3,335$ ,  $p = 0,084$ , parcial  $\eta^2 = 0,156$ ,  $n = 20$ ). Embora não tenha sido observada interação bidirecional significativa entre a intervenção e os fatores do grupo ( $F(1,18) = 2,371$ ,  $p = 0,141$ ,  $\eta^2$  parcial =  $0,116$ ,  $n = 20$ ), foram encontradas interações bidirecionais estatisticamente significativas entre os fatores exposição e grupo ( $F(1,18) = 10,288$ ,  $p = 0,005$ , parcial  $\eta^2 = 0,364$ ,  $n = 20$ ), bem como entre intervenção e exposição ( $F(1,18) = 5,528$ ,  $p = 0,030$ , parcial  $\eta^2 = 0,156$ ,  $n = 20$ ). Além disso, durante a exposição do gato, uma comparação *post hoc* mostra diferença significativa em relação ao grupo que recebeu muscimol antes da exposição e o que recebeu solução salina antes da exposição do gato (Diferença média =  $233,9$  s,  $p_{holm} < 0,001$ ,  $t = 5,098$ ). Além disso, durante a exposição do gato, foi observada uma redução significativa do comportamento de congelamento quando o muscimol foi injetado antes da exposição do gato em comparação com nenhuma intervenção (diferença média =  $137,7$  s,  $p_{holm} < 0,009$ ,  $t = 3,735$ ). Reforçando os achados, não foram observados efeitos estatísticos do fator de intervenção no grupo salina durante a exposição do gato ou do contexto (todos os  $p_{holm} > 0,99$ ). No que se refere ao comportamento de avaliação de risco, nem as interações bidirecionais nem a interação tripartida se mostraram estatisticamente significativas ( $F(1,18) < 3,366$ ,  $p > 0,083$ ,  $\eta^2$  parcial  $< 0,158$ ,  $n = 20$ ). Além disso, não foi observada significância estatística em nenhuma comparação pareada (todos os  $p_{holm} > 0,20$ ,  $t < 2,771$ ). O resumo gráfico do trabalho está apresentado na Figura 3.

**Figura 3** – Experimentos e observações feitas sobre o cuneiforme na esquerda da imagem e a direita os resultados encontrados (resumo gráfico do artigo II)



Fonte: elaborada pelo autor (2022).

## 4 CONCLUSÕES

Este estudo revela a relação da atividade observada da PAG dorsal com diferentes níveis de ameaça predatória e, em menor grau, com os comportamentos específicos. Tais resultados estão alinhados à ideia de que a PAG é um candidato provável para integrar emoções afetivas primitivas e mostrou que, em ratos, a PAG dorsal respondeu para aumentar a atividade gradativamente frente a níveis de ameaça maior. Portanto, seria importante, considerando as projeções ascendentes da PAG, examinar o papel em aspectos cognitivos da sensação de medo e a representação cortical de ameaças predatórias, aspectos críticos para influência da memória de medo (DE ANDRADE RUFINO *et al.*, 2019; DE LIMA *et al.*, 2022). Ademais, o artigo II revisa e expande o conhecimento que a literatura tem sobre as relações anatômicas e funcionais desse núcleo.

O CUN possui projeções bidirecionais importantes para diversos centros fundamentais para o circuito de defesa antipredatória ao integrar informações dolorosas, auditivas, de sombras vindas de cima (predador), olfatórias e, ainda, informações da PAG e de núcleos hipotalâmicos de defesa. Com base nas evidências apresentadas, o CUN pode ser visto funcionalmente como um componente caudal da PAG. A noção que esse núcleo participa da região locomotora mesencefálica é incompleta e já foi questionada em outros estudos. Este estudo ainda mostra que a estimulação do CUN em ratos promove comportamento de fuga e *freezing*, mesmo quando o rato está frente a um grilo, que normalmente evoca comportamento de caça e não de medo. Além disso, a inibição farmacológica do núcleo mostra que ele é importante para a execução do comportamento de defesa frente a uma ameaça predatória, uma vez que, quando a região é inibida, o comportamento de *freezing* perante o gato fica prejudicado. Não há evidências de influências do CUN nos processos mnemônicos, pois não foi observado posterior defesa condicionada ao contexto da estimulação optogenética nem alterações nas respostas condicionadas de medo frente ao contexto predatório nos experimentos de inibição com muscimol. Apesar do CUN e da PAG estarem envolvidos funcionalmente durante a resposta inata de defesa antipredatória, ao contrário da PAG dorsal, não há evidências de que o CUN influencia o processo de aquisição ou expressão do medo aprendido em resposta a ameaças predatórias.

Portanto, considerando as relações funcionais e anatômicas do CUN e da PAG dorsal e a importância de ambas as regiões na expressão do comportamento de medo, seria de grande valia examinar a influência do circuito inibitório e excitatório entre essas duas regiões.

## REFERÊNCIAS

- ADOLPHS, R. The biology of fear. **Current biology**, v. 23, n. 2, p. R79-R93, 2013.
- ALLEN, L. F.; INGLIS, W. L.; WINN, P. Is the cuneiform nucleus a critical component of the mesencephalic locomotor region? An examination of the effects of excitotoxic lesions of the cuneiform nucleus on spontaneous and nucleus accumbens induced locomotion. **Brain research bulletin**, v. 41, n. 4, p.201-210, 1996.
- ARNAULT, P.; ROGER, M. The connection of the peripeduncular area studied by retrograde and anterograde transport in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 258, n. 3, p. 463-476, 1987.
- ASSAREH, N. *et al.* The organization of defensive behavior elicited by optogenetic excitation of rat lateral or ventrolateral periaqueductal gray. **Behavioral neuroscience**, v. 130, n. 4, p. 406-414, 2016.
- BANDLER, R.; KEAY, K. A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. **Progress in brain research**, v. 107, p. 285-300, 1996.
- BANDLER, R.; SHIPLEY, M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends in neurosciences**, v. 17, n. 9, p. 379-389, 1994.
- BEITZ, A. J. Possible origin of glutamatergic projections to the midbrain periaqueductal gray and deep layer of the superior colliculus of the rat. **Brain research bulletin**, v. 23, n. 1-2, p. 25-35, 1989.
- BESSON, J. M.; FARDIN, V.; OLIVÉRAS, J. L. Analgesia produced by stimulation of the periaqueductal gray matter: true antinoceptive effects versus stress effects. *In*: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (Eds.). **A substância cinzenta periaqueductal do mesencéfalo**. Nova York: Plenum Press, 1991. p. 121-138.
- BINDI, R. P.; BALDO, M. V. C.; CANTERAS, N. S. Roles of the anterior basolateral amygdalar nucleus during exposure to a live predator and to a predator-associated context. **Behavioural brain research**, v. 342, p. 51-56, 2018.
- BINDI, R. P. *et al.* Neural correlates of distinct levels of predatory threat in dorsal periaqueductal grey neurons. **European Journal of Neuroscience**, v. 55, n. 6, p. 1504-1518, 2022.
- BITTENCOURT, A. *et al.* Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. **Neuroscience**, v. 125, n. 1, p. 71-89, 2004.
- BOURILHON, J. *et al.* Stimulation of the pedunculo-pontine and cuneiform nuclei for freezing of gait and falls in Parkinson disease: Cross-over single-blinded study and long-term follow-up. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 96, p. 13-17, 2022.

CAMERON, A. A. *et al.* The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. II. Descending projections. **Journal of Comparative Neurology**, v. 351, n. 4, p. 585-601, 1995.

CANTERAS, N. S.; GOTO, M. Connections of the precommissural nucleus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 408, n. 1, p. 23-45, 1999a.

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

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

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

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

CEZARIO, A. *et al.* Hypothalamic sites responding to predator threats—the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 5, p. 1003-1015, 2008.

COLES, S. K., ILES, J. F.; NICOLOPOULOS-STOURNARAS, S. The mesencephalic centre controlling locomotion in the rat. **Neuroscience**, n. 1, v. 28 149-157, 1989.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E.; 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 ANDRADE RUFINO, R. *et al.* The rostradorsal periaqueductal gray influences both innate fear responses and acquisition of fear memory in animals exposed to a live predator. **Brain Structure and Function**, v. 224, n. 4, p. 1537-1551, 2019.

DE FRANCESCHI, G. *et al.* Vision guides selection of freeze or flight defense strategies in mice. **Current biology**, v. 26, n. 16, p. 2150-2154, 2016.

DE LIMA, M. A. X. *et al.* The anterior cingulate cortex and its role in controlling contextual fear memory to predatory threats. **Elife**, v. 11, p. e67007, 2022.

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

FARROKHI, E. *et al.* Role of the nitrenergic system of the cuneiform nucleus in cardiovascular responses in Urethane-Anesthetized male rats. **Iranian journal of medical sciences**, v. 42, n. 5, p. 473-480, 2017.

- FOUGÈRE, M. *et al.* Optogenetic stimulation of glutamatergic neurons in the cuneiform nucleus controls locomotion in a mouse model of Parkinson's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 43, p. e2110934118, 2021.
- FURIGO, I. C. *et al.* The role of the superior colliculus in predatory hunting. **Neuroscience**, v. 165, n. 1, p. 1-15, 2010.
- GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature Review Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 651-658, 2012.
- GRUBER-DUJARDIN, E. 1-Role of the periaqueductal gray in expressing vocalization. **Handbook of Behavioral Neuroscience**, v. 19, p. 313-327, 2010.
- HAN, W. *et al.* Integrated control of predatory hunting by the central nucleus of the amygdala. **Cell**, v. 168, n. 1, p. 311-324. e18, 2017.
- JORDAN, L. M. Initiation of locomotion in mammals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 860, n. 1, p. 83-93, 1998.
- KINCHESKI, G. C. *et al.* The dorsolateral periaqueductal gray and its role in mediating fear learning to life threatening events. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. 1-13, 2012.
- KIROUAC, G. J. Placing the paraventricular nucleus of the thalamus within the brain circuits that control behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 56, p. 315-329, 2015.
- KOZAK, R. *et al.* Excitotoxic lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus in rats impair performance on a test of sustained attention. **Experimental brain research**, v. 162, n. 2, p. 257-264, 2005.
- KRAMER, M. A.; EDEN, U. T. **Case studies in neural data analysis: A guide for the practicing neuroscientist**. Massachusetts: MIT Press, 2016.
- LANTE, M. *et al.* Hindbrain structures involved in pain processing as revealed by the expression of c-Fos and other immediate early gene proteins. **Neuroscience**, v. 58, n. 2, p. 287-298, 1994.
- LARSON, C. R.; KISTLER, M. K. Periaqueductal gray neuronal activity associated with laryngeal EMG and vocalization in the awake monkey. **Neuroscience Letters**, v. 46, n. 3, p. 261-266, 1984.
- LAZIC, S. E.; CLARKE-WILLIAMS, C. J.; MUNAFÒ, M. R. What exactly is 'N' in cell culture and animal experiments? **PLoS biology**, v. 16, n. 4, p. e2005282, 2018.
- LIU, R.-J., QIANG, M.; QIAO, J.-T. Nociceptive c-fos expression in supraspinal areas in avoidance of descending suppression at the spinal relay station. **Neuroscience**, v. 85, n. 4, p. 1073-1087, 1998.
- LONSTEIN, J. S.; STERN, J. M. Role of the midbrain periaqueductal gray in maternal nurturance and aggression: c-fos and electrolytic lesion studies in lactating rats. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 9, p. 3364-3378, 1997.

- LONSTEIN, J. S.; STERN, J. M. Site and behavioral specificity of periaqueductal gray lesions on postpartum sexual, maternal, and aggressive behaviors in rats. **Brain research**, v. 804, n. 1, p. 21-35, 1998.
- LOVICK, T. Integrated activity of cardiovascular and pain regulatory systems: role in adaptive behavioural responses. **Progress in neurobiology**, v. 40, n. 5, p. 631-644, 1993.
- MASFERRER, M. E. *et al.* Differential encoding of predator fear in the ventromedial hypothalamus and periaqueductal grey. **Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 48, p. 9283-9292, 2020.
- MCGREGOR, I. S. *et al.* Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 17, p. 4134-4144, 2004.
- MENDES-GOMES, J. *et al.* Defensive behaviors and brain regional activation changes in rats confronting a snake. **Behavioural Brain Research**, v. 381, p. 112469, 2020.
- MITCHELL, I. J.; DEAN, P.; REDGRAVE, P. The projection from superior colliculus to cuneiform area in the rat. **Experimental brain research**, v. 72, n. 3, p. 626-639, 1988a.
- MITCHELL, I. J.; REDGRAVE, P.; DEAN, P. Plasticity of behavioural response to repeated injection of glutamate in cuneiform area of rat. **Brain research**, v. 460, n. 2, p. 394-397, 1988b.
- MORIIZUMI, T.; HATTORI, T. Anatomical and functional compartmentalization of the subparafascicular thalamic nucleus in the rat. **Experimental brain research**, v. 90, n. 1, p. 175-179, 1992.
- NETZER, F. *et al.* Brain circuits mediating baroreflex bradycardia inhibition in rats: an anatomical and functional link between the cuneiform nucleus and the periaqueductal grey. **The Journal of physiology**, v. 589, n. 8, p. 2079-2091, 2011.
- NETZER, F.; SÉVOZ-COUCHE, C. Rostral cuneiform nucleus and the defence reaction: Direct and indirect midbrain–medullary 5-HT mechanisms in baroreflex inhibition. **British Journal of Pharmacology**, v. 178, n. 8, p. 1819-1835, 2021.
- OLSEN, N.; FURLONG, T. M.; CARRIVE, P. Behavioural and cardiovascular effects of orexin-A infused into the central amygdala under basal and fear conditions in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 415, p. 113515, 2021.
- PALKOVITS, M. *et al.* Localization and chemical characterization of the audiogenic stress pathway. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1018 n. 1, p. 16-24, 2004.
- REDGRAVE, P.; DEAN, P. Does the PAG learn about emergencies from the superior colliculus? **The midbrain periaqueductal gray matter**, v. 213 p. 199-209, 1991.
- REIS, F. M. C. V. *et al.* Shared dorsal periaqueductal gray activation patterns during exposure to innate and conditioned threats. **Journal of Neuroscience**, v. 41, n. 25, p. 5399-5420, 2021.

RIBEIRO-BARBOSA, E. R. *et al.* An alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 8, p. 1255-1263, 2005.

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

SHAFEI, M. N. *et al.* Role of cuneiform nucleus in regulation of sympathetic vasomotor tone in rats. **Pathophysiology**, v. 19 n. 3, p.151-155, 2012.

SHIK, M. L.; SEVERIN, F. V.; ORLOVSKY, G. N. Control of walking and running by means of electrical stimulation of the midbrain. **Biophysics**, v. 11, p. 659-666, 1966.

SINNAMON, H. M. Preoptic and hypothalamic neurons and the initiation of locomotion in the anesthetized rat. **Progress in neurobiology**, v. 41, n. 3, p. 323-344, 1993.

TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 317-331, 2015.

VAN DER ZOUWEN, C. I. *et al.* Freely behaving mice can brake and turn during optogenetic stimulation of the mesencephalic locomotor region. **Frontiers in neural circuits**, v. 15, p. 639900, 2021.

VERBERNE, A. J. Cuneiform nucleus stimulation produces activation of medullary sympathoexcitatory neurons in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 268, n. 3, p.752-758, 1995.

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

WALKER, S. C.; WINN, P. An assessment of the contributions of the pedunculopontine tegmental and cuneiform nuclei to anxiety and neophobia. **Neuroscience**, v. 150, n. 2, p. 273-290, 2007.

WATSON, T. C. *et al.* Neural correlates of fear in the periaqueductal gray. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 50, p. 12707-12719, 2016.

YANG, M. *et al.* The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. **Physiology & behavior**, v. 81, n. 3, p. 465-473, 2004.

YASUI, Y.; NAKANO, K.; MIZUNO, N. Descending projections from the subparafascicular thalamic nucleus to the lower brain stem in the rat. **Experimental brain research**, v. 90, n. 3, p. 508-518, 1992.

ZEMLAN, F. P.; BEHBEHANI, M. M. Afferent projections to the nucleus cuneiformis in the rat. **Neuroscience letters**, v. 52, n. 1-2, p. 103-109, 1984.