

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA  
Laboratório de Neuroanatomia Funcional

**THIAGO SANTOS GOUVÊA**

**Estudo anátomo-funcional do Colículo  
Superior na integração de informação  
sensorial das vibrissas durante o  
comportamento predatório em ratos**

Ribeirão Preto / SP

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**THIAGO SANTOS GOUVÊA**

**Estudo anátomo-funcional do Colículo  
Superior na integração de informação  
sensorial das vibrissas durante o  
comportamento predatório em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade  
de São Paulo para obtenção do título de  
Mestre em Ciências (Área de concentração:  
Fisiologia)

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Comoli

Ribeirão Preto / SP

2009

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

### FICHA CATALOGRÁFICA

GOUVÊA, Thiago Santos

Estudo anátomo-funcional do Colículo Superior na integração de informação sensorial das vibrissas durante o comportamento predatório em ratos.

Ribeirão Preto / SP, 2009.

83 p. 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Comoli, Eliane.

1. Colículo Superior    2. Comportamento Predatório    3. Vibrissas    4. Integração sensorial

GOUVÊA, Thiago Santos

Estudo anátomo-funcional do Colículo Superior na integração de informação sensorial das vibrissas durante o comportamento predatório em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências (Área de concentração: Fisiologia)

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Eliane Comoli

Julgamento: \_\_\_\_\_

Instituição: FMRP - USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas

Julgamento: \_\_\_\_\_

Instituição: FMRP - USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Elisabeth Spinelli de Oliveira

Julgamento: \_\_\_\_\_

Instituição: FFCLRP - USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade São Paulo e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização a pesquisa.

Ao Estado brasileiro em suas diversas instâncias, pelo fomento à pesquisa.

À coordenação e ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela dedicação e excelência.

Aos colegas discentes do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelas experiências compartilhadas. Em especial, aos colegas de laboratório Pedro Cedraz-Mercez e Plinio Favaro.

À minha orientadora, Profa. Dra. Eliane Comoli.

Ao Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas e à Profa. Dra. Elisabeth Spinelli de Oliveira, que junto com a Profa. Dra. Eliane Comoli compõem a comissão julgadora desta dissertação.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

*A guerra deve ser em função da paz,  
a atividade em função do ócio,  
as coisas necessárias e úteis em função das belas.*

Aristóteles

*Foi a indústria que separou o lar do trabalho, a vida das mulheres da vida dos homens, o cansaço da diversão. Foi com o advento da indústria que o trabalho assumiu uma importância desproporcionada, tornando-se a categoria dominante na vida humana, em relação à qual qualquer outra coisa – família, estudo, tempo livre – permaneceu subordinada.*

Domenico De Masi

## ABREVIATURAS<sup>1</sup>

ac	Comissura Anterior
AQ	Aqueduto Cerebral
BLAa	Núcleo Basolateral da Amígdala, parte anterior
BLAp	Núcleo Basolateral da Amígdala, parte posterior
BMAa	Núcleo Basomedial da Amígdala, parte anterior
C	Camadas Centrais do Tecto Óptico
CEA	Núcleo Central da Amígdala
CEAm	Núcleo Central da Amígdala, parte medial
COAa	Núcleo Cortical da Amígdala, parte anterior
CP	Caudoputâmen
CPvl	Caudoputâmen, porção ventrolateral
CS	Colículo Superior
CSI	Colículo Superior, camadas intermediárias, porção lateral
CSm	Colículo Superior, porção medial
ec	Cápsula Externa
FDP	Feixe Pré-Dorsal
FS	Fundo do Estriado
LGN	Núcleo Geniculado Lateral do Tálamo
lot	Trato Olfativo Lateral
MG	Núcleo Geniculado Medial do Tálamo
P	Camadas Periventriculares do Tecto Óptico
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
PAGl	Substância Cinzenta Periaquedutal, coluna lateral
PARN	Núcleo Reticular Parvicelular
PIR	Córtex Piriforme
PrV	Núcleo Principal do Nervo Trigêmeo
S	Camadas Superficiais do Tecto Óptico
SAI	Camada Branca Intermediária do Colículo Superior
SAP	Camada Branca Profunda do Colículo Superior
SC	Superior Colliculus
SCI	Superior Colliculus, lateral part
SGI	Camada Cinzenta Intermediária do Colículo Superior
SGP	Camada Cinzenta Profunda do Colículo Superior
SGS	Camada Cinzenta Superficial do Colículo Superior
SNr	Substantia Nigra pars Reticulata
SpV	Núcleo Espinhal do Nervo Trigêmeo
SSp	Córtex Somatossensorial Primário
SZ	Camada Zonal do Colículo Superior
TO	Tecto Óptico
ZI	Zona Incerta

---

<sup>1</sup> As abreviaturas foram extraídas do "Brain Maps: Structure of the Rat Brain", Swanson, L.W (2004), 3<sup>rd</sup> Edition; para o Colículo Superior seguimos May, P.J. (2006).



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	5
1.1.	Comportamento predatório .....	5
1.2.	Neurobiologia do comportamento predatório.....	7
1.3.	O Colículo Superior.....	9
1.4.	Sistema sensorial das vibrissas .....	16
2.	OBJETIVOS .....	18
2.1.	Objetivos gerais .....	18
2.2.	Objetivos específicos .....	18
3.	METODOLOGIA.....	19
3.1.	Seleção comportamental dos ratos que foram utilizados em nossos experimentos .....	19
3.2.	Habituação comportamental.....	20
3.3.	Teste de predação .....	21
3.4.	Remoção das vibrissas .....	22
3.5.	Reconstituição das vibrissas .....	24
3.6.	Análise comportamental.....	25
3.7.	Perfusão e histologia.....	26
3.8.	Detecção imunohistoquímica da proteína Fos.....	29
3.9.	Análise da marcação da proteína Fos .....	30
3.10.	Análise estatística.....	31
3.11.	Baratário.....	32
4.	RESULTADOS .....	34
4.1.	Estudo neuroetológico do comportamento predatório em ratos, envolvendo o sistema sensorial das vibrissas.....	34
4.1.1.	Descrição comportamental observada em nossos experimentos, em animais com vibrissas intactas (Vib).....	34
4.1.2.	Descrição comportamental observada em nossos experimentos, em animais com vibrissas removidas (VibX). .....	36
4.1.3.	Descrição comportamental observada em nossos experimentos, em animais com vibrissas reconstituídas (VibR); experimento # 2. ....	40
4.2.	Imunorreatividade à proteína Fos em encéfalos de ratos em estudo envolvendo remoção das vibrissas .....	42
5.	DISCUSSÃO .....	50
5.1.	Considerações metodológicas sobre o uso da proteína Fos como marcadora de atividade neuronal.....	50

5.2. Implicações funcionais do sistema sensorial das vibrissas no comportamento predatório em ratos.....	51
5.3. Dados anatômicos e implicações funcionais no comportamento predatório em ratos .....	55
5.4. A importância do Colículo Superior na integração da informação sensorial e motora no comportamento predatório .....	58
6. CONCLUSÃO.....	62

## RESUMO

Em estudo de mapeamento funcional dos sítios encefálicas envolvidos com o comportamento predatório em ratos, através de imunodeteção da proteína Fos, Comoli e Canteras (2000) encontraram ativação das porções laterais das camadas intermediárias do Colículo Superior (CSI), não observada em outras situações comportamentais, tais como confronto com um predador natural, nado forçado, choque nas patas, ou após consumo de ração (Comoli e Canteras, 2000; Comoli et al., 2005). Os autores também relataram que a lesão bilateral na região do CSI com ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) comprometeu o desempenho do comportamento predatório. Os animais lesados apresentaram movimentos apráxicos da musculatura orofacial e patas dianteiras, e consequente dificuldade na captura, imobilização e manuseio das presas. Tais animais se mostraram menos responsivos aos movimentos de deslocamento das presas, estímulo este muito eficiente em eliciar uma resposta de orientação e ataque imediata e muito acurada em ratos normais (Comoli e Canteras, 2000). Estudos com traçadores neuronais e estimulação elétrica sugerem que o CSI origina uma via descendente envolvida com movimentos de orientação e perseguição (Redgrave et al., 1986, Dean et al., 1989). Comoli e Canteras sugeriram que tanto o deslocamento da presa como o contacto das vibrissas são estímulos fundamentais para desencadear a predação, e que esses estímulos podem estar envolvidos com o aumento da marcação de Fos no CSI na predação, uma vez que o CSI recebe aferências sensoriais de estruturas relacionadas à sensibilidade da face e das vibrissas através dos núcleos espinhal (SpV) e principal (PrV) do complexo trigeminal (Comoli e Canteras, 2000; Hemelt e Keller, 2007; Huerta et al., 1983, Killackey e Erzurumlu, 1981), Zona Incerta (ZI) (Kolmac et al., 1998; Comoli e Canteras, 2000), núcleo reticular parvicelular (PARN) e córtex somatossensorial primário (SSp) (Cohen et al., 2008; Comoli e Canteras, 2000). No intuito de melhor compreender o papel do CSI no comportamento predatório, nós avaliamos a influência das vibrissas na predação no contexto da circuitaria colicular. Para tal, os ratos

foram habituados às condições experimentais e então expostos a baratas vivas e íntegras da espécie *Leurolestes circumvagans*. Após a predação, as vibrissas foram removidas e depois de 48 horas os animais foram expostos novamente às presas. Os animais sem vibrissas predaram satisfatoriamente. Entretanto, observamos um menor número de ataques certos sobre as presas. Tal déficit comportamental foi revertido após reconstituição das vibrissas ao tamanho original (30 dias após a remoção). Avaliamos o padrão de marcação de Fos no CSI durante o comportamento predatório, tanto de ratos com vibrissas intactas como daqueles sem vibrissas, e verificamos que houve uma diminuição da marcação de Fos na extremidade lateral da camada branca intermediária, enquanto na extremidade lateral da camada cinzenta intermediária a marcação se manteve. Em conjunto, os dados anatômicos e comportamentais sugerem que as vibrissas não são fundamentais para desencadear a predação, mas são importantes para uma melhor acuidade de ataques. Sugerimos que a marcação de Fos observada no CSI possa estar mais relacionada aos componentes motores da predação, e que os animais lesados bilateralmente no CSI não predaram eficientemente por terem sofrido principalmente uma perda motora. A morte de células na camada branca do CSI decorrente da lesão poderia estar relacionada com os possíveis déficits de orientação observados nesses animais. Diferentemente, os animais sem vibrissas ficam menos providos de informações sensoriais espaciais que poderiam levar à localização espacial mais precisa das presas e gerar ataques mais certos.

Palavras-chave: Colículo Superior, comportamento predatório, vibrissas, integração sensorial

## ABSTRACT

A previous study, examining the expression of Fos protein, suggests the key neural systems mobilized during predatory behavior of rats hunting cockroaches (Comoli et al 2005). Of particular interest, it was found that predation induces a distinct activation of the lateral region of the intermediate layer of the Superior Colliculus (SCI), which does not appear to be particularly mobilized in other behavioral situations, such as after nocturnal peak of food ingestion, defensive responses in a confront with the natural predator, forced swimming and so forth. Several literature data support the idea that deep layers of SC are related to motor control and sensory guided behaviors. In order to understand the potential roles of this collicular region in the context of predation, those authors analyzed the hunting performance of animals before and after iontophoretic NMDA lesions bilaterally placed into SCI. Notably, collicular lesions did not interfere with the motivation to pursue the roaches, but they did induce severe deficits related to motor praxia, i.e., lesioned animals handled the preys very awkwardly and were unable to capture and hold them efficiently. In addition, lesioned animals could not properly orient themselves toward fast moving roaches, which is an immediate and accurate reflex in rats not surgically manipulated nor lesioned at SCI. Tract-tracing and electrophysiological studies suggest that a pathway descending from SCI is involved in orienting movements towards moving objects (Redgrave et al., 1986, Dean et al., 1989). Comoli and Canteras suggest that contact with whiskers could be a triggering stimulus to predatory behavior once SCI receives information related to somatosensory sensibility from the whiskers and orofacial region coming from spinal (SpV) and principal trigeminal nuclei (PrV) (Comoli and Canteras, 2000; Hemelt and Keller, 2007; Huerta et al., 1983, Killackey and Erzurumlu, 1981), Zona Incerta (ZI) (Kolmac et al., 1998; Comoli and Canteras, 2000), parvicelular reticular nucleus (PARN) and somatosensory cortex (SSp) (Cohen et al., 2008; Comoli and Canteras, 2000). Our experiments contributed to better understand the neural basis of predatory hunting in rats, especially the role of SCI. We

evaluated how effectively sensory information from whiskers can mediate predatory behavior in the context of collicular circuitry. Rats were repeatedly handled during seven days and then were allowed to hunt by the exposure to mature intact roaches. After predation their whiskers were removed and they were allowed to predate roaches again 48 hours afterwards. Whisker-removed rats showed to be efficient in hunting insects, however, they perform less straight attacks. Animals with re-grown whiskers to the original size (30 days off whiskers removal) recover the number of precise attacks towards roaches. We observed that Fos expression at lateral intermediate grey layer of SC of whisker-removed rats was maintained while the lateral intermediate white layer of SC showed less Fos labeling. Anatomical data suggest that Fos expression at lateral intermediate grey layer of SC might be more related to motor components of predation and that the reason why animals lesioned at SCI did not predate efficiently is more related to motor loss. Cell death at white layer should be related to possible orienting deficits also observed in lesioned animals. On the other hand, whisker-removed rats were less provided with spatial information that could take to more precise spatial localization of preys and generate more certain attacks.

Keywords: Superior Colliculus, predatory behavior, whiskers, vibrissae, sensory integration

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Comportamento predatório

Em um estudo de caráter conceitual sobre a agressividade, Moyer (1968) realizou uma categorização dos comportamentos agressivos, objetivando orientar os trabalhos empíricos futuros sobre as bases fisiológicas da agressividade. Segundo Moyer (1968), comportamento agressivo é o termo que se aplica aos comportamentos que levam, ou que aos olhos de um observador aparentem levar, ao dano ou destruição de uma entidade alvo. Ao partir desta definição, o autor afirma que o comportamento predatório enquadra-se como uma das grandes classes do comportamento agressivo. O autor sugere, também, que os comportamentos agressivos são tão diversos que parece claro que deva haver uma variedade de substratos fisiológicos envolvidos.

À época deste trabalho, o conhecimento acerca das bases fisiológicas do comportamento predatório era bastante restrito, mas em sua revisão Moyer fornece algumas diretrizes para a caracterização comportamental da predação e a distinção entre esta e as demais formas de agressividade. Segundo o autor, a predação se distingue das outras formas de agressividade primeiramente pela especificidade da situação-estímulo que a elicia, representada por um objeto-presa específico cujo deslocamento aumenta a probabilidade do ataque; e que o ambiente onde o comportamento predatório ocorre é relativamente irrelevante. Outra característica importante da agressividade predatória é a relativa ausência de respostas autonômicas marcantes.

Outro aspecto distintivo da agressividade predatória, destacado tanto por Moyer (1968) quanto por O'Boyle (1975), é sua topografia própria. Os movimentos realizados por um animal que ataca uma presa são característicos e distintos dos movimentos realizados pelo mesmo animal quando ataca um animal co-específico em outro contexto agressivo. Adicionalmente, a topografia do comportamento predatório é espécie-específica (Moyer, 1968).

Este último aspecto do comportamento predatório, a topografia, foi investigado a partir de uma perspectiva filogenética por Eisenberg e Leyhausen (1972). Alguns aspectos da topografia do comportamento predatório descritos por Leyhausen (1965) como filogeneticamente recentes podem ser observados em ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, ao caçar insetos. Entre eles, a capacidade de capturar a presa com as patas dianteiras além da boca, e de realizar mordidas fatais, direcionadas a pontos vitais da presa como a cabeça. O padrão comportamental predatório desempenhado por ratos são similares àqueles apresentados por pequenos insetívoros (Eisenberg & Leyhausen, 1972). Assim como os insetívoros, o rato utiliza a boca como órgão primário para capturar e matar suas presas. No entanto, diferentemente dos insetívoros que utilizam exclusivamente a boca, a capacidade de manipular a presa utilizando os membros anteriores é de extrema importância para os ratos, seja no momento da ingestão ou em situações na qual as presas escapam, em que o predador tentará retomar a captura e contenção da presa.

De qualquer forma, é interessante notar que a presença destas habilidades em ratos de laboratório, que provavelmente passaram várias gerações sem precisar lutar para obter seu próprio alimento, sugere fortemente que a necessidade de predação de insetos desempenhou um papel importante na história filogenética dessa espécie.

O'Boyle (1975) destaca outros aspectos do comportamento predatório que o distinguem das demais formas de agressividade; os ataques são em geral interespecíficos, e se relacionam com o comportamento alimentar. A privação de comida aumenta a probabilidade de ataque, ainda que não seja imprescindível para que um animal apresente comportamento predatório. De fato, Myer e White (1965) demonstraram que a oportunidade de se envolver em uma situação de predação possui valor reforçador em ratos, mesmo quando não se permite que o predador se alimente da presa.

A motivação presente no comportamento predatório é influenciada tanto pelo caráter lúdico da captura das presas, quanto pelo valor energético da recompensa obtida pela execução da predação, já que insetos como as baratas, que possuem agilidade e



estratégias de fuga, representam um desafio para os roedores durante a captura, além de se constituírem como uma fonte rica em proteínas e abundante em seu habitat (Negrão e Schmidek, 1987; Nishida, 1987). Portanto, se estabelece uma dificuldade para dissociar estes dois componentes do comportamento predatório, tendo em vista que a predação é executada tanto por animais alimentados, quanto por animais privados de alimento (observações do nosso laboratório).

Assim sendo, a fome não é essencial para a manifestação do comportamento predatório uma vez que os predadores continuam a predar mesmo que sua capacidade de comer a presa tenha sido excedida ou ele esteja saciado (observações do nosso laboratório), mas a privação alimentar na predação estimulada hipotalamicamente pode encurtar o período de latência de matar a presa (ver Polsky, 1975).

## **1.2. Neurobiologia do comportamento predatório**

Grande parte da literatura sobre as bases fisiológicas da agressividade predatória se baseia em um modelo de agressão interespecífica em que ratos atacam camundongos (ver O'Boyle, 1975). Esse modelo, no entanto, apresenta algumas limitações. Os ratos precisam estar privados de comida por alguns dias para predar camundongos, e mesmo assim isto só ocorre com uma pequena porcentagem dos ratos (aproximadamente 16%; Vergnes, 1975; ver Comoli et. al., 2003). Além disso, o confronto com um camundongo vivo é frequentemente associado com respostas defensivas exacerbadas, tais como congelamento motor e fuga, e desta forma parte dos episódios de ataque podem na verdade constituir comportamento defensivo (Moyer, 1968). Uma boa alternativa para o estudo do comportamento predatório é o modelo em que ratos predam insetos. Neste modelo, as baratas foram escolhidas como uma presa apropriada por serem inócuas, facilmente manipuláveis, não induzirem respostas defensivas e serem bem recebidas como presas por ratos de diferentes linhagens (Rebouças e Schmidek, 1997).

A caracterização das áreas do Sistema Nervoso Central envolvidas no comportamento predatório de caçar baratas foi feita por imunodeteção da proteína Fos, em que foi observada uma supra-regulação da imunorreatividade à Fos em sítios prosencefálicos relacionados à organização da seqüência de ações estereotipadas observada na predação, tais como setores ventrolaterais do Caudo-putâmen (CPvl); assim como setores relacionados aos valores motivacionais referentes à presa; tais como um circuito amigdaliano envolvido com o comportamento alimentar, incluindo a parte anterior do núcleo Cortical da Amígdala (COAa), a parte anterior do Núcleo Basomedial da Amígdala (BMAa), a parte posterior do Núcleo Basolateral da Amígdala (BLAp) e a parte medial do Núcleo Central da Amígdala (CEAm); e ainda estruturas envolvidas com respostas digestivas e metabólicas do tronco que são alvos do CEA (Comoli *et al.*, 2005); e por fim a coluna lateral da Substância Cinzenta Periaquedutal (PAGl) em seus níveis mais rostrais (Comoli *et al.*, 2003); e a porção lateral das camadas intermediárias do Colículo Superior (CSI) (Comoli e Canteras, 2000).

Comoli e Canteras (1998, 2000) relataram aumento da marcação de proteína Fos no CSI de animais que haviam executado o comportamento de predação de insetos, não observado naqueles que expressaram o comportamento alimentar, ou outros comportamentos observados no laboratório, tais como nado forçado, choque nas patas, comportamento de defesa na presença do predador (Comoli e Cedraz-Mercez, 2009; Cedraz-Mercez e Comoli, 2009), e durante o pico de ingestão de ração no início do período escuro. Estes dados corroboram a idéia de que a movimentação da presa ou o contacto com as vibrissas seriam estímulos biologicamente importantes para a predação tendo em vista que o Colículo Superior (CS) é uma estrutura envolvida em movimentos de orientação guiados sensorialmente (Dean *et al.*, 1989; Waleszczyk *et al.*, 2004) e que deve exercer um papel crítico na predação.

Ainda, de acordo com as observações comportamentais em ratos antes e após lesões neurotóxicas com **NMDA (N-Methyl-D-Aspartic Acid)** bilateralmente no CSI, Comoli

e Canteras (2000) sugerem que o CSI exerce um papel chave para a organização do movimento de captura da presa; uma vez que animais lesados no CSI apresentam déficits comportamentais e ascensionais. Esses animais apresentaram movimentos apráxicos da musculatura orofacial e das patas dianteiras, daí a dificuldade de controlarem a abertura e fechamento do maxilar inferior e das patas dianteiras, portanto, não serem capazes de abocanhar efetivamente as presas; e também de não serem capazes de agarrá-las com as patas dianteiras, e manuseá-las propriamente; conseqüentemente as presas escapavam com facilidade após várias tentativas de capturá-las, resultando no fracasso da consumação das mesmas. Consideramos, ainda, que esses animais podem apresentar déficits sensoriais sérios, uma vez que também demonstram falta de orientação em relação ao deslocamento das presas. Freqüentemente, mesmo se aproximando das presas, esses animais não detectam os movimentos de deslocamento das presas e elas passam despercebidas no seu campo visual. Ataque certo e captura seriam reflexos imediatos muito acurados em ratos não manipulados cirurgicamente ou lesados bilateralmente na CSI.

Esses dados instigaram fortemente nosso interesse no estudo do sistema colicular no comportamento de caçar baratas.

### **1.3. O Colículo Superior**

O CS é uma estrutura neural localizada bilateralmente na superfície dorsal do mesencéfalo de mamíferos e organizada em camadas celulares e fibrosas alternadas. É limitado rostralmente pela Área Pré-Tectal, ventralmente pela Substância Cinzenta Periaquedutal e tegumento mesencefálico e caudalmente pelo Colículo Inferior. É o homólogo de uma estrutura mesencefálica presente em vertebrados, em geral chamada Tecto Óptico (TO).

A história filogenética do TO é resgatada por Huber e Crosby em trabalho datado de 1933. Esses autores relatam uma considerável variabilidade interespecífica acerca da

arquitetura do TO, que é composto por duas ou três camadas em alguns anfíbios próximos às salamandras e por até quinze em alguns répteis e aves (Figura 1).

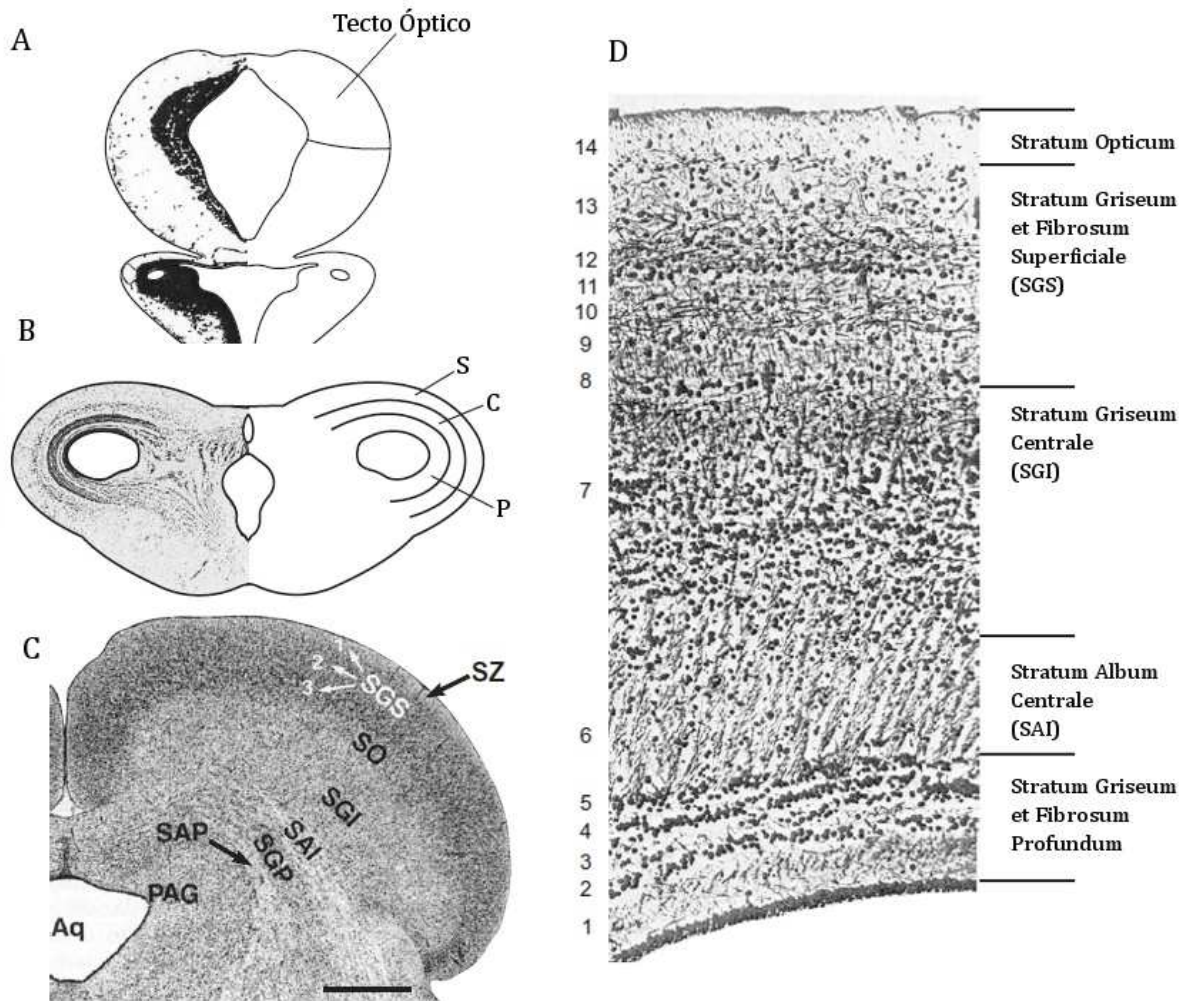
A organização laminar do TO em mamíferos é ligeiramente diferente daquela prototípica fornecida por Huber e Crosby (1933). O TO, então já denominado CS, apresenta a seguinte organização básica:

**Stratum Zonale (SZ):** Camada fibrosa constituída por terminais das fibras córtico-tectais (Huber e Crosby, 1933).

**Stratum Griseum Superficiale (SGS):** Camada celular envolvida com o processamento de informação visual. Recebe aferências visuais diretas da Retina e indiretas do Córtex Visual, Núcleo Geniculado Lateral (LGN) do Tálamo (Sefton et al., 2004) e Área Pré-Tectal (Born e Schmidt, 2004), além de se comunicar com o CS contralateral (May, 2006).

**Stratum Opticum (SO):** Camada fibrosa, composta principalmente por fibras retino-tectais (May, 2006).

As camadas SZ, SGS e SO constituem as camadas superficiais do CS, as quais estão primariamente relacionadas ao processamento de informação visual (May, 2006). Não apresentam eferências motoras diretas. Antes, suas projeções eferentes se direcionam principalmente para os núcleos talâmicos visuais, para a Área Pré-Tectal e para as camadas profundas do CS (Sefton et al., 2004; Doubell et al., 2003). Através de suas conexões interlaminares com as camadas profundas, as camadas superficiais do CS exercem importante papel na integração visuo-motora ao exercer controle sobre a direção do olhar (ver Isa e Sasaki, 2002). Por causa da função primariamente visual das camadas superficiais, é comum que se considere indiscriminadamente e erroneamente o CS inteiro como uma estrutura visual.

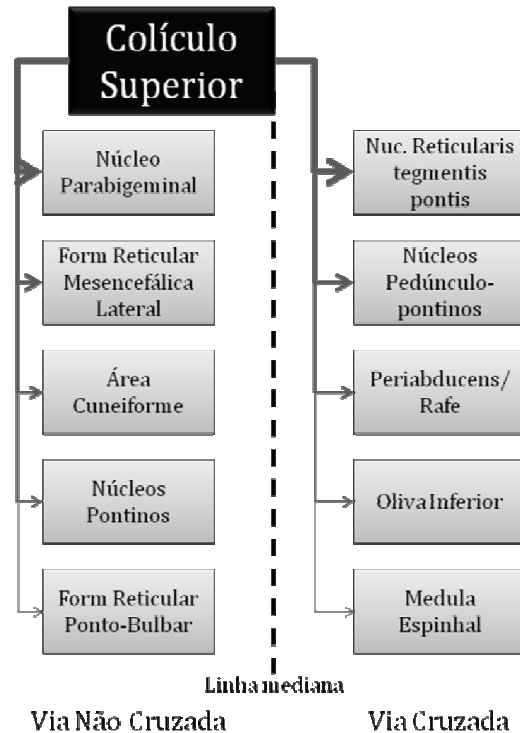


**Figura 1** – Representações do Tecto Óptico (TO) em diferentes taxa. A) Secção transversa através do mesencéfalo de uma salamandra (*Salamandra salamandra*) com desenho esquemático da metade contralateral. Notar as duas únicas camadas que compõem o TO, uma cinzenta periventricular e uma branca externa. Adaptado de Fritsch (1980) (ver Butler e Hodos, 2005). B) Secção transversa através do mesencéfalo de um sapo-boi (*Rana catesbeiana*) com desenho esquemático da metade contralateral. S: camadas superficiais. C: camadas centrais. P: camadas periventriculares. Notar as camadas centrais (C) que se interpõem entre a cinzenta periventricular (P) e a branca externa (S). Adaptado de Wilczynski e Northcutt (1983) (ver Butler e Hodos (2005). C) Hemiseção transversa através do CS direito de um esquilo em preparação de coloração de Nissl. A camada cinzenta superficial se subdivide em outras três subcamadas. Notar a diferenciação relativamente maior que em anfíbios, e menor que em répteis. Adaptado de Major et al. (2000) (ver Butler e Hodos, 2005). D) Porção de uma hemiseção transversa através do TO de um lagarto (*Iguana iguana*). À direita, os nomes das camadas. Entre parênteses são indicados os nomes das camadas equivalentes em mamíferos. Notar à esquerda as catorze camadas. Adaptado de Northcutt (1984) (ver Butler e Hodos, 2005).

**Stratum Griseum Intermediale (SGI) e Stratum Album Intermediale (SAI):** As camadas intermediárias do CS recebem diversas aferências sensoriais visuais, não-visuais e aferências não-sensoriais modulatórias. Entre elas, aferências das camadas superficiais do CS (Doubell et. al., 2003), do Córtex Visual, Área Pré-Tectal, Colículo Inferior, Córtex Somatossensorial Primário (SSp), Complexo Sensorial Trigeminal (Killackey e Erzurumlu, 1981; Huerta et al., 1983), núcleos sensoriais da Coluna Dorsal, Zona Incerta (ZI) (Kolmac et al., 1998), Formação Reticular Mesencefálica Central, Córtex Pré-Frontal e Substantia Nigra pars Reticulata (SNr) (Redgrave et.al., 1992; Comoli e Canteras 2000) Adicionalmente, apresenta conexões comissurais com o SGI contralateral, envia projeções ascendentes para o tálamo dorsal (Krout et al., 2001; Comoli e Canteras, 2000) e ZI (Kolmac et al., 1998; Comoli e Canteras, 2000) e projeções descendentes tectoespinhais (Isa e Sasaki, 2002), além de dar origem ao Fascículo Pré-dorsal (FPD), um dos principais componentes da via eferente descendente cruzada do CS (Dean et. a., 1988; Redgrave et. al., 1990; ver May, 2006).

**Stratum Griseum Profundum (SGP) e Stratum Album Profundum (SAP):** As camadas profundas do CS, assim como as intermediárias, recebem informação sensorial de diversas modalidades diferentes e apresentam eferências ascendentes talâmicas e descendentes motoras (Sefton et al., 2004; Comoli e Canteras, 2000).

Em conjunto, as camadas SGI, SAI, SGP e SAP são comumente denominadas camadas profundas do CS. Distinguem-se das camadas superficiais por receberem grande quantidade de informação sensorial não-visual e por apresentar projeções eferentes motoras, tanto diretas quanto indiretas. As principais vias eferentes motoras do CS são ilustradas na Figura 2. Através destas conexões, as camadas profundas do CS exercem importante papel no controle dos movimentos de orientação.



**Figura 2** – Representação esquemática das duas principais vias eferentes descendentes do CS em ratos. O diagrama mostra o CS esquerdo. A via cruzada ou contralateral cruza a linha mediana na decussação tegumentar dorsal para integrar o Fascículo Pré-Dorsal (FPD). A via não-cruzada ou ipsilateral segue caudal e ventralmente e atinge estruturas localizadas principalmente no Mesencéfalo e Ponte. Adaptado de Dean et al. (1988) (ver Redgrave et al. (1990).

Tanto a via cruzada como a via não-cruzada produzem movimentos de orientação. Entretanto, dado o fato de que as aferências sensoriais do CS são em geral contralaterais, ou seja, uma metade do CS recebe informação sensorial da metade contralateral do campo visual ou do corpo, a via descendente não-cruzada, cujas eferências motoras são ipsilaterais, acaba por produzir movimentos de orientação para o sentido oposto ao do objeto-estímulo (movimentos de afastamento do estímulo), enquanto a via descendente cruzada, cujas eferências motoras são contralaterais, gera movimentos de orientação no sentido do objeto-estímulo (movimentos de aproximação ao estímulo) (Dean et al., 1989). É pertinente notar que, conforme revisto por Dean et al. (1989), as células de origem das vias descendentes cruzada e não-cruzada se distribuem distintamente ao longo do eixo mediolateral do CS; enquanto as células da via descendente não-cruzadas se concentram na porção medial do CS (CSm), aquelas que originam a via descendente cruzada encontram-se principalmente nas porções laterais do CS, região onde se observou

marcação de Fos em ratos que predaram baratas (Comoli e Canteras, 2000). Desta forma, os dados anatômicos mencionados parecem sugerir que o CSI está relacionado a movimentos de aproximação a estímulos, enquanto o CSm produz movimentos de afastamento de um estímulo. De fato, esta predição é corroborada por estudos envolvendo estimulação elétrica do CS (Sahibzada et al., 1986; King et al., 1986). De maneira coerente com o exposto, o CSm parece ser uma região mais relacionada com a defesa (Dean et al., 1988; Schenberg, 2005).

O CS sabidamente participa no comportamento defensivo em ratos (Schenberg et al., 2005), e respostas defensivas, como congelamento motor e fuga, assim como alterações cardiovasculares, podem ser eliciadas por estimulação elétrica ou química do CSm (Dean et al., 1988; Keay et al., 1990a). Lesões nessa área podem reduzir a resposta defensiva a ameaças visuais (Blanchard, 1981), e sabe-se que as porções mediais do CS recebem projeções de algumas áreas encefálicas envolvidas em comportamentos de defesa, tais como o circuito de defesa na zona medial do hipotálamo (Canteras e Swanson, 1992; Canteras et al., 1994; Favaro e Comoli, 2009). Ainda mais, o CSm apresenta-se ativo durante o comportamento de defesa na presença de um predador (Comoli e Cedraz-Merchez, 2009; Cedraz-Merchez e Comoli, 2009).

Por outro lado, conforme mencionado (Comoli e Canteras, 2000), as porções laterais do CS que se apresentam ativas na predação incluiriam a região de origem das vias descendentes cruzadas. Dean et al. (1989) relatam que alguns dos movimentos de orientação produzidos pela injeção de antagonistas gabaérgicos nas camadas intermediárias do CS, simulando experimentalmente uma ativação fisiológica pelos gânglios da base, lembram muito a perseguição de objetos em movimento, tal como uma presa, e de fato a estimulação de alguns locais do CS que produzem movimentos de perseguição também resulta em mordidas e movimentos de roer (Kilpatrick et al., 1982). Curiosamente, Butler e Hodos (2005), em um texto acerca da história filogenética do CS, afirmam que o CS desempenha um papel significativo na predação e que o grau em que o trato tectoespinal é



desenvolvido em mamíferos correlaciona-se diretamente com o grau de predação em uma dada espécie.

Os dados funcionais e anatômicos referentes às projeções eferentes do CS mencionados até aqui caracterizam o CSI como uma estrutura neural envolvida no controle de movimentos de aproximação a estímulos. Entretanto, para melhor se compreender o contexto funcional em que o CSI desempenha seu papel, é importante que se conheça a natureza das informações das quais esta estrutura está sob influência.

Em estudos de rastreamento neuronal retrógrado (Comoli e Canteras, 2000; Favaro e Comoli, 2009) observamos que O CSI recebe informações de diversos sistemas sensoriais, em especial de sítios que veiculam informações da região das vibrissas e do focinho tais como da ZI e Núcleo Reticular Parvicelular (PARN) (Kolmac et al., 1998; Comoli e Canteras, 2000, Favaro e Comoli, 2009), SSp (Comoli e Canteras, 2000; Hoffer et al., 2005; Favaro e Comoli, 2009), além de projeções diretas do núcleo Principal do Trigêmeo (PrV) e do núcleo Espinhal do Trigêmeo (SpV) (Killackey e Erzurumlu, 1981; Huerta et al., 1983; Comoli e Canteras, 2000; Favaro e Comoli, 2009). Ainda recebe informações sensoriais viscerais, através da Área Parabraquial, e possivelmente olfativas, indiretamente através do Campo Retrorrubral (Comoli e Canteras, 2000; Favaro e Comoli, 2009). Por outro lado, o CSI recebe, também, projeções de elementos motores tais como SNr (Redgrave et al., 1992), Núcleo Pedúnculo Pontino e Núcleo Denteado do Cerebelo (Comoli e Canteras, 2000; Favaro e Comoli, 2009).

Além da sugestão fornecida pelos dados anatômicos mencionados, a integração de informações sensoriais provenientes das vibrissas ao nível da circuitaria colicular em ratos foi estabelecida através de estudos eletrofisiológicos (Hemelt e Keller, 2007, 2008; Cohen et al., 2008).

#### **1.4. Sistema sensorial das vibrissas**

As vibrissas faciais têm sido reconhecidas como fonte importante de informações sensoriais para roedores desde o início do século passado (Vincent, 1912), sendo que a sua mobilidade e sensibilidade foi desenvolvida em ratos para compensação parcial da pobre visão e pela demanda do ambiente escuro, visto o hábito noturno dos ratos.

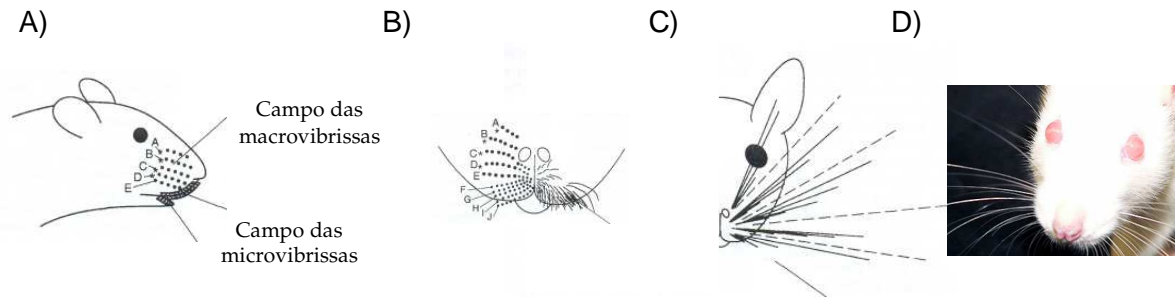
O sistema sensorial das vibrissas tem atraído, recentemente, o interesse de pesquisadores no estudo de sistemas sensoriais e integração sensório-motora (Grant et al., 2009; Diamond et al., 2006, 2008; Jadhav et al., 2009; Wolfe et al., 2008).

Em um estudo em que observaram as vibrissas de diversos mamíferos filogeneticamente distantes, Brecht et al. (1997) encontraram uma série de características na organização das vibrissas que foram altamente conservadas evolutivamente. Um dos resultados primários desta análise foi a classificação das vibrissas em dois grandes grupos morfofuncionalmente distintos: as microvibrissas e as macrovibrissas (Figura 3).

Segundo os autores, as microvibrissas se caracterizam por serem curtas, posicionadas frontalmente e continuando do lado interno dos lábios superiores e no maxilar inferior e estarem presentes em grande quantidade em uma área relativamente pequena, o que confere ao sistema uma boa resolução espacial e permite a discriminação ou reconhecimento de objetos. Parece que as microvibrissas são análogas no sistema sensorial das vibrissas à fóvea no sistema visual ou às pontas dos dedos no sistema tátil de humanos.

As macrovibrissas, por sua vez, são longas, localizadas dorsolateralmente em relação às microvibrissas e organizam-se em linhas paralelas, com espaçamento máximo entre as linhas e mínimo dentro de uma mesma linha. Apresentam orientação perpendicular ao eixo rostrocaudal do animal, de modo que as vibrissas de uma mesma linha formam planos divergentes com as vibrissas de outras linhas. Ao contrário do que se pode pensar, as macrovibrissas parecem não ter função de discriminação de objetos, mas de obtenção de informação espacial em maior alcance e menor resolução, que podem levar à localização

espacial de objetos a serem explorados e reconhecidos pelas microvibrissas (Brecht et. al., 1997).



**Figura 3:** Esquema das macro e microvibrissas mistaciais no rato. A) Vista lateral das vibrissas faciais (fileiras A, B, C, D e E de macrovibrissas); B) Esquema frontal das microvibrissas faciais continuando em direção ao interior do lábio superior (lado direito) e posição dos folículos do lado esquerdo (fileiras A, B, C, D e E de macrovibrissas; e fileiras F, G, H, I, e J de microvibrissas) C) Vista esquemática frontal do direcionamento das macrovibrissas. (Esquema modificado de Brecht et. al. 1997). D) Imagem das vibrissas faciais do rato.

Comportamentos visuo-motores e reconhecimento visual de objetos têm sido estudados em detalhes, enquanto pouco se sabe sobre representação tátil de objetos. Na tentativa de entender o comportamento de orientação tátil Anjum et. al. (2006) avaliaram a captura de grilos por musaranhos etruscos selvagens (*Suncus etruscus*), um dos menores mamíferos. Os musaranhos são animais pequenos de alta taxa metabólica, hábito noturno e que são forçados a capturar e matar uma grande quantidade de presas no escuro. Os autores constataram que para os musaranhos tanto as micro como as macrovibrissas são importantes para o sucesso dos ataques, e que as macrovibrissas são importantes para o direcionamento dos ataques.

Assim, na tentativa de melhor compreender os sistemas neurais envolvidos no comportamento predatório, tivemos o interesse em avaliar a importância da informação tátil das vibrissas na caça de baratas, em especial no contexto da circuitaria colicular. Para tal realizamos experimentos comportamentais com ratos normais (vibrissas intactas), ratos cujas vibrissas foram removidas e posteriormente após a reconstituição das vibrissas (30 dias após terem sido removidas); associando a expressão da proteína Fos ao comportamento predatório em ratos com vibrissas intactas e ratos com vibrissas removidas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

A proposta do presente trabalho foi investigar a importância da informação tátil proveniente do sistema sensorial das vibrissas na ativação do Colículo Superior durante o desempenho do comportamento predatório de caçar baratas em ratos.

### **2.2. Objetivos específicos**

Para alcançar os objetivos gerais, os objetivos específicos desse trabalho foram:

- 1) Avaliar as alterações no comportamento predatório de caçar baratas decorrentes da remoção das vibrissas;
- 2) Avaliar as alterações no padrão de ativação neuronal no Colículo Superior, no contexto do comportamento predatório de caçar baratas, decorrentes da remoção das vibrissas;
- 3) Avaliar a reversibilidade das alterações no comportamento predatório de caçar baratas decorrentes da remoção das vibrissas, após a reconstituição das vibrissas.

### 3. METODOLOGIA

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), machos, adultos pesando entre 200 e 250 g, mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) sob temperatura de 23°C sendo o período de claro/escuro de 12/12h com início às 6 horas, com água e ração *ad libitum*.

Os ratos foram individualizados em gaiolas convencionais, e inicialmente passados por um processo de seleção comportamental de predação e, em seguida, por oito dias foram submetidos ao processo de habituação às condições experimentais e ao experimentador, para posteriormente serem submetidos aos experimentos comportamentais de predação de baratas, conforme descrição adiante.

As baratas da espécie *Leurolestes circumvagans*, utilizadas como presas, foram criadas e mantidas em um baratário, sob condições adequadas, no Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em recinto distinto daqueles onde os ratos permaneceram. Maiores detalhes da criação e manejo das baratas são apresentados adiante.

O presente protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP, segundo o registro nº133/2007.

#### **3.1. Seleção comportamental dos ratos que foram utilizados em nossos experimentos**

Inicialmente foi realizada uma avaliação geral da resposta de comportamento predatório dos ratos. Para tal, os ratos foram privados de alimento por um período de 24 horas. A seleção inicia-se com a introdução de cada rato na gaiola comportamental (Figura 4), onde permanecem por 60 minutos. Ao final deste período, cinco baratas vivas íntegras foram introduzidas na gaiola com o auxílio do aplicador de presas. Os ratos foram

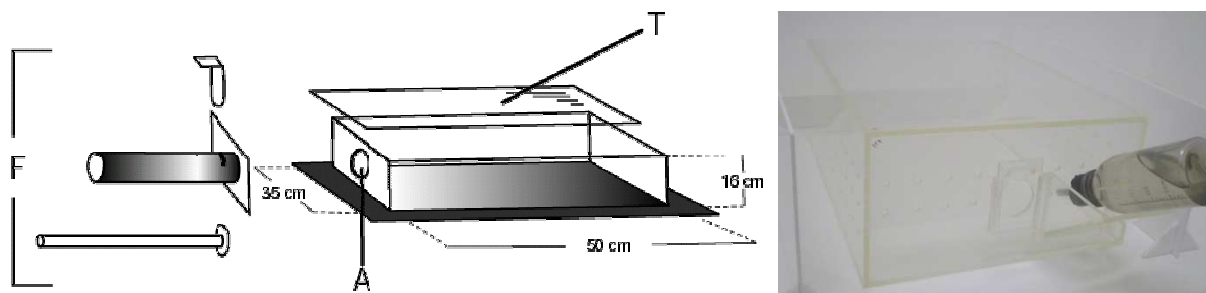
observados por 60 minutos e aqueles que apresentaram motivação e interação com as presas foram mantidos em nossos experimentos.

### **3.2. Habituação comportamental**

No dia seguinte, após o procedimento de seleção comportamental, os animais foram submetidos ao processo de habituação às condições experimentais e ao experimentador por um período de oito dias. Assim, os animais foram levados do biotério para a sala de comportamento, a qual é climatizada e isolada acusticamente, onde foram colocados em gaiolas comportamentais de acrílico (50comp x 35larg x16alt cm) com tampo transparente (Figura 4), com água e ração *ad libitum*. Cada animal foi manuseado pelo mesmo experimentador por 5 minutos, sempre no mesmo horário e colocado na gaiola comportamental onde permaneceu por 2 horas. Ao final da sessão, cada animal foi recolocado individualizadamente na gaiola convencional e reconduzido ao biotério, onde era mantido a uma temperatura de (23°C), com água e comi da *ad libitum*.

A habituação comportamental teve por objetivo expor os ratos ao ambiente no qual seria executado o teste comportamental, permitindo que estes se habituassem ao ambiente da gaiola comportamental e ao experimentador e com isso minimizássemos ou abolíssemos o estresse da manipulação durante a execução do protocolo experimental, e ainda, reduzíssemos a interferência do estresse induzido pela situação experimental sobre os resultados comportamentais e de marcação da proteína Fos.

Segue ilustração da gaiola comportamental usada em nossos experimentos (Figura 4).



**Figura 4:** Ilustração esquemática da gaiola comportamental onde era realizado o teste de predação baratas, com suas respectivas dimensões: T: tampo; A: orifício na parede da gaiola, onde era acoplado o fornecedor de presas; F: fornecedor de presas (à esquerda). Fotografia da gaiola comportamental (à direita).

### 3.3. Teste de predação

No oitavo dia os animais ( $n = 17$ ) que foram habituados às condições experimentais e ao experimentador foram individualizados nas gaiolas comportamentais e mantidos com água e comida *ad libitum* durante 2 h e após este período foram introduzidas simultaneamente 5 baratas vivas e íntegras da espécie *Leurolestes circumvagans* acoplando-se um fornecedor de presas a um orifício em uma das paredes da gaiola comportamental.

O fornecedor consistira de um tubo de PVC (5cm de diâmetro e 14cm de comprimento) com uma porta em guilhotina na extremidade proximal à gaiola e um êmbolo tampando a outra extremidade. No início do teste a porta em guilhotina fora aberta e o êmbolo empurrado, e as baratas, aí previamente colocadas, foram, então, introduzidas na gaiola comportamental (Figura 1).

O comportamento foi filmado de modo que as análises comportamentais qualitativas e quantitativas foram realizadas posteriormente.

A filmagem do comportamento foi efetuada por uma filmadora digital, a qual se encontrava disposta acima das gaiolas, sob uma haste de metal de dois metros afixada nas duas paredes laterais da sala de comportamento, onde a filmadora tinha liberdade para “correr” por toda a extensão da haste. Sendo assim, os parâmetros comportamentais foram analisados a partir das imagens obtidas de uma vista superior da gaiola.

Sessenta minutos após o teste comportamental, alguns dos animais ( $n = 5$ ) foram anestesiados e perfundidos conforme descrito adiante. Seus encéfalos foram processados

histologicamente e reagidos imunohistoquimicamente para detecção da proteína Fos, conforme descrito adiante.

Os outros 12 animais, após predarem os insetos, tiveram suas vibrissas faciais laterais removidas e foram novamente expostos as baratas e o comportamento filmado de modo que as análises comportamentais qualitativas e quantitativas foram realizadas posteriormente.

### **3.4. Remoção das vibrissas**

Esses experimentos envolvendo remoção das vibrissas foram importantes para avaliar a importância da informação tátil das vibrissas na caça de baratas no contexto da circuitaria do CS.

No oitavo dia, após terem sido expostos as baratas os animais (n = 12) tiveram suas macrovibrissas removidas bem próximo à base de inserção no folículo, na pele, para que não pudessem mais identificar estímulos táteis através dessa via sensorial. A retirada das vibrissas faciais foi feita sob anestesia (mistura de cetamina, xilazina e acepromazina; 33: 7: 1mg/kg, i.p peso corpóreo, ip.) sob o microscópio cirúrgico (OPMI pico, Zeiss) com o uso de uma pequena pinça (Figura 5). A dose de anestésicos empregada foi suficiente para produzir um estado de anestesia geral por aproximadamente 15 minutos. Foram removidas tanto as macrovibrissas, longas e organizadas em linhas rostrocaudais paralelas, quanto as microvibrissas, curtas, densas e localizadas ventralmente e externamente aos lábios.

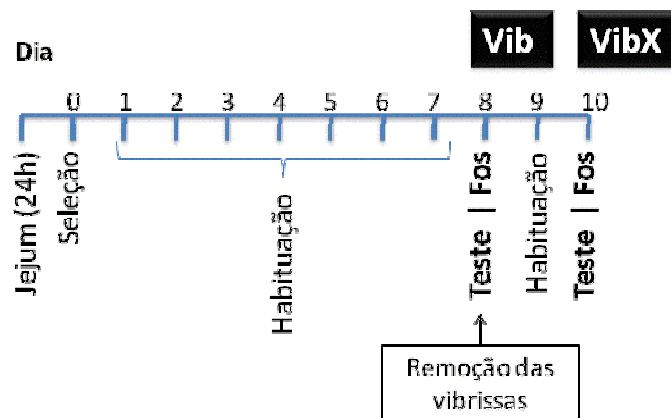




**Figura 5** – Rato cujas vibrissas foram removidas.

Após 48 horas da recuperação anestésica, os ratos foram colocados nas gaiolas comportamentais onde foram introduzidas simultaneamente 5 baratas vivas e íntegras da espécie *Leurolestes circumvagans*, conforme descrito previamente. O comportamento foi filmado de modo que as análises comportamentais qualitativas e quantitativas foram realizadas posteriormente. Sessenta minutos após a expressão comportamental alguns dos animais ( $n = 5$ ) foram anestesiados, perfundidos conforme descrito adiante e seus cérebros processados histologicamente e reagidos imunohistoquimicamente para detecção da proteína Fos, conforme descrito adiante.

Segue resumo esquemático do experimento # 1.



**Figura 6** – Representação esquemática do Experimento # 1. Os animais ( $n = 17$ ) foram selecionados e habituados. No oitavo dia, após a realização do teste comportamental cinco desses animais foram perfundidos para imunohistoquímica da proteína Fos e os outros 12 animais tiveram suas vibrissas removidas para serem novamente expostos as baratas após 48 horas. Os animais receberam a denominação de Vib quando foram submetidos ao primeiro teste comportamental, no oitavo dia. Foram denominados VibX no segundo teste comportamental (décimo dia), em que estavam sem suas vibrissas. Cinco animais VibX foram sacrificados após o segundo teste para detecção imunohistoquímica da proteína Fos. A análise comportamental foi realizada com os 12 animais que participaram dos dois testes comportamentais.

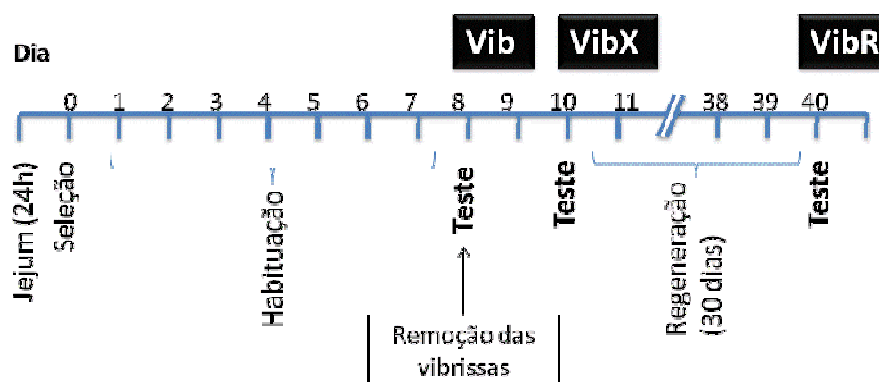
### 3.5. Reconstituição das vibrissas

Outro grupo de animais ( $n = 8$ ) foi utilizado em nossos experimentos. Após seleção e habituação comportamental esses animais foram submetidos ao teste de predação. Também tiveram suas vibrissas removidas e após 48 horas foram expostos as baratas. Em seguida esses animais foram mantidos no biotério e após 30 dias, então com suas vibrissas reconstituídas foram novamente expostos as baratas. O comportamento desses animais foi filmado nas três etapas de exposição às baratas de modo que as análises comportamentais qualitativas e quantitativas foram realizadas posteriormente.

O objetivo desse experimento foi verificar se as alterações comportamentais observadas no experimento #1 seriam revertidas após a reconstituição das vibrissas ao tamanho original.

É importante mencionarmos que ao longo da vida dos ratos suas vibrissas podem ser quebradas ou mesmo sofrerem quedas, e novas vibrissas crescerem. Dessa forma, tivemos o cuidado de realizar previamente experimentos pilotos em que avaliamos se as vibrissas reconstituídas apresentavam indícios de funcionalidade na situação de predação. Para tal observamos animais que não haviam sido expostos às baratas previamente, e cujas vibrissas estavam reconstituídas (30 dias após sua remoção). Observamos que esses animais apresentavam comportamento exploratório e movimento de suas vibrissas quando colocados na gaiola comportamental e na presença das baratas, assim quando do manuseio das mesmas.

Segue resumo esquemático do experimento # 2.



**Figura 7** - Representação esquemática do Experimento # 2. Os animais ( $n = 8$ ) foram selecionados e habituados. Foram submetidos ao teste de predação no oitavo dia, momento em que foram denominados Vib. Tiveram suas vibrissas removidas e após 48 horas foram submetidos a outro teste, em que foram denominados VibX. Após 30 dias, então com as vibrissas reconstituídas foram submetidos a mais um teste, em que foram denominados VibR. A análise comportamental foi realizada com os 8 animais que participaram dos três testes comportamentais.

### 3.6. Análise comportamental

Realizamos uma análise quantitativa do padrão geral do comportamento predatório para o experimento # 1 ( $n = 12$ ), levando em consideração os seguintes elementos comportamentais.

**Latência da predação:** tempo desde a introdução das baratas na gaiola comportamental até o primeiro ataque;

**Caça:** tempo que o animal apresenta comportamento de busca das presas, se deslocando, e atacando as presas;

**Contato:** tempo que a barata desaparece sob o rato, na área que se estende desde o ombro até o focinho do rato;

**Outros:** tempo que o animal apresenta outros comportamentos exceto Contato e Caça, tais como de autolimpeza, comer ração, beber água, dormir, etc.

**Duração:** tempo decorrido entre o início da predação até o final da sessão comportamental, isto é, do primeiro ataque até o consumo da última barata, limitado ao máximo de 30 minutos.

Outra análise comportamental foi realizada para o experimento # 1 e para o experimento # 2. Nessa análise foram abordados outros aspectos do comportamento predatório, tais como o número ataques realizados sobre as presas:

**Ataques certos:** ataques precisos em que num único movimento o rato agarra e mantém a presa em suas patas ou na boca;

**Ataques não-certos:** ataques imprecisos nos quais são necessários vários movimentos incertos até que o rato consiga agarrar e manter a presa em suas patas dianteiras ou na boca.

**Número Total de Ataques:** número de ataque certos e ataques não-certos realizados pelo rato durante a sessão experimental.

Nessa análise comportamental avaliamos sessões comportamentais com duração total de 20 minutos .

### **3.7. Perfusão e histologia.**

A perfusão é a primeira etapa na preparação do tecido neuroanatômico para a microscopia, tendo como objetivo a preservação do tecido para que este se mantenha em um estado próximo ao natural durante os processos subseqüentes.

A perfusão foi realizada através do fluxo intravascular forçado de uma solução com propriedades fixadora, por meio de uma bomba peristáltica. Fixadores servem para estabilizar os detalhes estruturais de células e tecidos (Fox et al., 1985), e em especial os aldeídos, que são os fixadores mais comumente utilizados, desempenham tal função através da formação de ligações, com proteínas, conhecidas como “pontes de metileno”. Utilizamos como fixador o paraformaldeído (95 %, Sigma-Aldrich®), que é um grande polímero de formaldeído comercializado na forma de um pó branco (Kiernan, 2000). Como

fixador, a solução deverá conter o formaldeído monomérico como seu principal soluto, sendo que para tal, o polímero de paraformaldeído deverá ser hidrolisado a formaldeído, sendo esta reação catalisada pela presença de íons  $\text{OH}^-$ , encontrado em soluções levemente alcalinas, e por um tratamento térmico da solução (Kiernan, 2000).

A perfusão foi realizada 60 minutos após a sessão comportamental, objetivando que o tecido nervoso fosse fixado durante o período de pico do acúmulo da proteína Fos no núcleo celular, que ocorre de 60 a 90 minutos após o estímulo (Morgan e Curran, 1991; 1995).

Após período de 60 minutos da caça às baratas, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (Merk, 0.4ml/100g de peso corpóreo) e por uma bomba peristáltica (Cole Parmer, MasterFlex L/S economy drive) foram perfundidos via trans-aórtica com solução salina 0.9% à temperatura ambiente, seguida de paraformaldeído 4% (pH 7.4) à 4°C por 15 minutos, e novamente lavados com 150 ml de salina 0.9%. Para tal procedimento, o animal foi afixado em decúbito dorsal, numa plataforma de dissecação, onde foi submetido a uma incisão abdominal e a caixa torácica do animal foi aberta; o coração foi, então, exposto para introdução de uma agulha de intubação através do ventrículo esquerdo até aorta, onde foi fixada. Imediatamente, foi realizada uma secção no átrio direito e, em seguida, se iniciou o fluxo de 200 mL de solução salina 0.9 %. Ao final da perfusão de salina se iniciou a perfusão do fixador. No início da perfusão do fixador, observamos a ocorrência de fasciculações musculares dos membros anteriores. Esta etapa é importante, pois uma boa perfusão é caracterizada por fasciculações dos músculos quando exposto ao fixador, seguido por um rápido enrijecimento dos músculos (Bolam, 1992). Em seguida, rapidamente foi colocado gelo ao redor e sobre a cabeça do animal, enquanto a perfusão do fixador foi mantida por um período de 15 minutos. Para finalizar a perfusão, foi retomada a perfusão de 150 mL de solução salina 0.9 %. Após perfusão, os cérebros permaneceram na caixa craniana por 3 horas, na geladeira, e foram removidos e colocados em tampão fosfato de sódio 0.1M contendo sacarose 20% por 12h.

Cortes de 30 $\mu$ m de espessura no plano frontal foram obtidos com um micrótomo de congelação (Leica SM 2000R) e armazenados em placas de 24 poços em forma seqüencial, de modo que armazenamos 4 amostras representativas de toda extensão do encéfalo, sendo a distância entre dois cortes adjacentes no mesmo compartimento de 120 $\mu$ m.

Os poços das quatro placas foram preenchidos com 2 mL de soluções distintas: placa I foi preenchida com solução KPBS 0,02 M; placa II com solução anti-fúngica de azida de sódio 0,02 %, e placa III e IV com solução anticongelante.

Ao final da microtomia os cortes depositados na placa com KPBS foram incubados em anticorpo primário para imunodeteção da proteína Fos.

Os cortes coletados na placa contendo azida de sódio 0,02 % foram destinados à montagem de lâminas, e posteriormente foram submetidos à coloração de Nissl. Esta coloração revela a citoarquitetura dos cortes adjacentes àqueles submetidos à imunohistoquímica, sendo uma importante referência para a localização das regiões que tiveram imunomarcações da proteína Fos.

### 3.8. Detecção imunohistoquímica da proteína Fos

Para imunodeteccção da proteína Fos inicialmente os cortes foram lavados por 30min com KPBS 0.02M. Em seguida, os cortes foram incubados em soluçao de KPBS 0,02M contendo Triton X-100 0,3% e Soro Normal de Cabra 2 % usando-se um anticorpo primário anti-proteína Fos feito em coelho (Rabbit Polyclonal IgG, Calbiochem Laboratory) na diluição de 1:20.000 por 72 horas à 4°C com agitaçao constante em rotômetro orbital inclinado em 45 graus, à 5rpm.

Para localizaçao do complexo antígeno-anticorpo os cortes foram incubados por 1h e 30 minutos no anticorpo secundário biotinilado feito em cabra (Biotynilated Anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories) na diluição 1:200. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado pela técnica de imunoperoxidase com o complexo biotina-avidina (ABC Elite Kit, Vector Laboratories) para ligar a peroxidase ao complexo antígeno-anticorpo, e o cromógeno tetrahydrocloreto de 3-3'diaminobenzidina (DAB), segundo Itoh et.al. (1979) e Shu et al. (1988). Após lavagens sucessivas, foram incubados em uma soluçao contendo 50mg de DAB, 0,6 mg de glicose oxidase e 40mg de cloreto de amônio em 100ml de tampao fosfato de sódio 0,1M por 5 minutos. Em seguida foi adicionado  $\beta$ -D-glicose, e a reaçaõ enzimática foi interrompida após 10 minutos.

Os cortes foram montados em lâminas recobertas com gelatina, e tratados com tetróxido de ósmio 0.05M para melhor visualizaçao do produto da reaçaõ (Newman et al., 1983). Em seguida passaram por uma bateria de alcoóis de concentraçoes crescentes para desidrataçao e, entao, permaneceram em Xilol por pelo menos 1 hora. Em seguida as lâminas foram recobertas com DPX e lamínulas. Outro compartimento foi corado pelo método da tionina para referênci citoarquitetônica. O material foi observado em microscópio de campo claro, e com auxílio de uma câmara lúcida foi feita a reproduçao esquemática da distribuicão dos núcleos marcados com proteína Fos. Esses desenhos foram editados no programa Adobe Illustrator. Ainda, imagens foram capturadas através de

câmara digital (Leica, DFC 290) e com auxílio do programa Adobe Photoshop foram feitos pequenos ajustes de brilho e contraste.

### **3.9. Análise da marcação da proteína Fos**

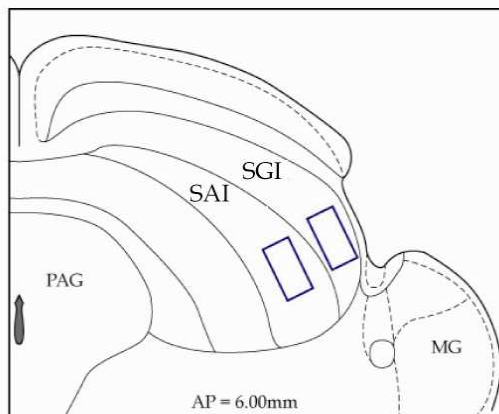
Os cortes imunorreagidos para proteína Fos foram observados ao microscópio óptico em campo claro, quando foi realizada uma análise qualitativa do padrão de marcação nos sítios neurais sabidamente ativos durante a predação (Comoli e Canteras, 2000; Comoli et al., 2005).

No nosso estudo, os setores de maior interesse foram os níveis rostrocaudais intermediários do CS em que observamos um maior desenvolvimento do CS, sendo que o ângulo formado entre o CS e o Núcleo Genuculado Medial do tálamo se apresenta mais proeminente (AP  $\cong$  6.0 mm). Sabidamente, em estudos prévios de lesões neuroquímicas bilaterais nesse setor foram observados déficits comportamentais (Comoli e Canteras, 2000).

Assim sendo, para realizarmos uma estimativa do número de núcleos celulares marcados com proteína Fos, em animais com (Vib, n = 5) e sem vibrissas (VibX, n = 5), foram selecionados três cortes em níveis intermediários do CS por encéfalo (AP  $\cong$  6.0 mm), sendo cortes adjacentes no mesmo compartimento (distantes 120  $\mu$ m entre si).

Os cortes selecionados foram desenhados com o auxílio de uma câmera lúcida acoplada ao microscópio óptico (Leica, DM 2500), em aumento de 40x. Os limites externos e internos do CS foram desenhados em campo escuro, e os núcleos marcados com Fos foram desenhados em campo claro. Ainda no mesmo aumento, com o auxílio da câmera lúcida e utilizando-se um retículo, foi delimitada a área correspondente a um retângulo de 500 x 250  $\mu$ m para realização da contagem dos núcleos marcados. Os retângulos foram posicionados na camada cinzenta intermediária (SGI) e na camada branca intermediária (SAI) do CS, conforme ilustrado na Figura 8.





**Figura 8** – Representação esquemática de corte frontal do cérebro de rato ao nível do CS (AP  $\cong$  6.00mm), modificada do atlas “The Rat Brain in the stereotaxic coordinates”, Paxinos e Watson (2007), 6ª edição. Os retângulos ilustram os locais onde foram realizadas contagens de núcleos marcados com proteína Fos. (MG: núcleo geniculado medial do tálamo; PAG: substância cinzenta periaquedutal; SAI: camada branca intermediária; SGL: camada cinzenta intermediária).

### 3.10. Análise estatística

Na maioria das nossas análises foram empregados testes não-paramétricos adequados para análise de nossos dados. Os testes não paramétricos são adaptáveis aos dados das ciências do comportamento pelas seguintes razões:

a) essas provas estatísticas chamam-se “distribuição livre” não requerendo suposições sobre a distribuição da população da qual tenham sido extraídos os dados para análise, e;

b) essas técnicas não-paramétricas podem ser aplicadas a dados que não sejam exatos do ponto de vista numérico, mas que se disponham em “postos” ou “ranks” (Siegel, 1975). Os dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão. Um nível de significância 0,05 foi adotado em todos os testes efetuados.

Os testes foram feitos com auxílio do software GraphPad InStat®, versão 3.05. Os gráficos foram elaborados com auxílio do software GraphPad Prism®, versão 5.00.

#### **Análise Estatística empregada na Análise Comportamental.**

Para verificar a existência de não igualdade na análise geral do comportamento predatório, no experimento # 1, aplicamos o teste Wilcoxon para amostras pareadas (duas

amostras dependentes), nos animais antes (Vib) e após a remoção das vibrissas (VibX) para as variáveis: latência, caça, contacto, outros e duração do comportamento.

Também empregamos o teste de Wilcoxon para verificar a não igualdade do número de ataques certos, não certos e totais, e das respectivas taxas desses ataques, nos animais antes (Vib) e após remoção das vibrissas (VibX) para o experimento # 1.

No experimento # 2, para verificar a existência de não igualdade na análise do número de ataques certos, não certos e totais, e das respectivas taxas desses ataques nos animais antes (Vib), após remoção das vibrissas (VibX) e com as vibrissas reconstituídas (VibR) aplicamos o teste estatístico paramétrico de análise de variância (ANOVA) para variáveis dependentes acima de duas medidas repetidas, seguida do pós-teste Tukey-Kramer.

Análise Estatística empregada na estimativa do número de núcleos celulares marcados com proteína Fos.

Para verificar a existência de não igualdade nos valores referentes ao número de núcleos marcados com proteína Fos na região lateral das camadas intermediárias do Colículo Superior em animais antes (Vib) e após remoção das vibrissas (VibX) aplicamos o teste estatístico de Mann-Whitney (para duas amostras independentes).

### **3.11. Baratário**

As baratas da espécie *Leurolestes circumvagans* foram mantidas no biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP, em temperatura ambiente, em um baratário que consiste em uma caixa de polietileno (Martinite, mod. 1018 com dimensões de 89.0 comp x 48.5 larg x 56.0 alt cm e capacidade de 195l) com um tampo de madeira e tela de metal, dentro da qual são colocados recipientes de plástico com algodão umedecido e ração de diversos tipos, tais como de gato e de cachorro, *ad libitum*. Internamente ficam dispostas verticalmente dezenas de placas de papelão (placas de suporte para ovos) que são utilizadas como refúgios para os animais. Na borda superior interna do baratário é feita uma

faixa de 10cm com uma fina camada de vaselina, para que as baratas não caminhem até a tampa da caixa, e para impedir que as baratas escapem quando a tampa do baratário é aberta.

A manutenção da disponibilidade de água e ração é feita diariamente e, ao menos uma vez por mês, é realizada higienização completa do baratário para que haja crescimento de uma colônia saudável e se evite super-crescimento da colônia.

As baratas são retiradas conforme necessidade experimental, tomando-se cuidados no manuseio para que não tenham sua agilidade comprometida e não haja interferência na resposta comportamental do rato quando expostos a elas. Assim, minutos antes dos testes de predação, as baratas são apanhadas pelo experimentador cuidadosamente, de forma que estejam íntegras e sem prejuízo da agilidade no momento do teste. Este cuidado se faz necessário porque o rápido deslocamento das baratas é um importante fator eliciador do comportamento predatório (Moyer, 1968). As baratas são transportadas até a sala de comportamento dentro do fornecedor de presas.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Estudo neuroetológico do comportamento predatório em ratos, envolvendo o sistema sensorial das vibrissas**

#### **4.1.1. Descrição comportamental observada em nossos experimentos, em animais com vibrissas intactas (Vib)**

A situação de predação de nossos experimentos inicia-se com o rato (Vib) explorando a gaiola comportamental com seu focinho e vibrissas, principalmente as arestas e vértices inferiores da gaiola. Este comportamento de exploração não se identifica com aquele típico de um animal exposto a um ambiente novo, como o observado em ratos recém colocados na arena experimental, pois, na situação dos nossos experimentos de predação, o animal já está no ambiente experimental há aproximadamente 2 horas, e encontra-se frequentemente em repouso. Entretanto, quando as presas são inseridas na arena, o animal desperta e passa a explorar o ambiente, farejando a caixa como mencionado.

Observamos que os ratos com vibrissas (Vib) quando percebem algo novo na gaiola, geralmente se aproximam na tentativa de explorar e, em seguida, passam a tocar o objeto (barata).

Decorrido o período de latência ( $86 \pm 50$ s, média  $\pm$  EPM; Figura 10), o rato se depara com uma presa e, especialmente quando está se deslocando, realiza um ataque com um movimento ágil da cabeça ou das patas dianteiras, ataque este que pode ou não culminar na captura efetiva e imobilização da presa. Ainda persegue-as linearmente ou realiza movimentos translacionais diversos com o corpo e apreende-as pelo abdômen com as patas dianteiras ou mesmo com a boca. Após a apreensão de uma das baratas, o rato rapidamente a manipula e frequentemente a mantém com o ventre voltado para si e a cabeça para cima. Desta forma, o predador mantém as patas da presa longe do chão evitando sua fuga, e expõe suas partes vulneráveis ao ataque, como a cabeça e o

tórax/abdômen. Assim, com uma mordida arranca-lhe a cabeça, imobilizando-a imediatamente, e a come. Os ratos expressam sequências de movimentos estereotipados até consumirem todas as baratas dispersas na gaiola comportamental.

Muito frequentemente, com a presa abatida em suas patas dianteiras, o rato levava a barata para um dos cantos da gaiola e passava a ingeri-la, manipulando e mordendo sua extremidade rostral (mais frequentemente) (Figura 9). Geralmente, o animal elege um dos cantos da caixa como favorito para a ingestão das presas, e para lá se desloca após cada captura. Este comportamento se assemelha àquele de um animal em *habitat* natural, que, para ingerir a presa, busca um local onde esteja a salvo de um competidor ou um predador.

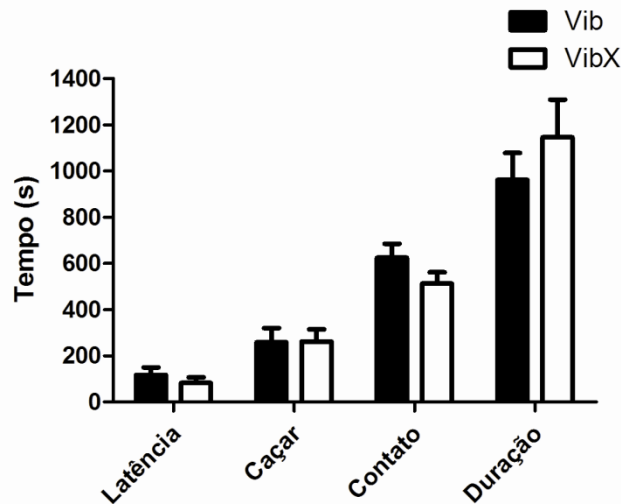


**Figura 9** – Rato ingerindo barata em um dos cantos da arena

Geralmente os ratos deixavam restos de baratas como pernas, asas e carapaças, sempre voltando para comê-los, no intervalo entre as capturas. Em algumas circunstâncias os ratos matavam mais de uma barata para depois consumirem-nas. Mesmo não restando baratas vivas na gaiola experimental, os animais ainda permaneciam por volta de mais 20 minutos procurando-as, e depois iam dormir.

Interessantemente, muitas vezes, ao introduzir as baratas na gaiola experimental, observava-se que os ratos permaneciam no canto da gaiola sem procurar ou perseguir as presas, mas, se por ventura uma delas tocasse nas suas vibrissas, eles desencadeavam orientação imediata e ataque certo à presa.

Observamos que os animais com vibrissas (Vib) levaram  $795 \pm 139$  s para predar as cinco presas, sendo  $144 \pm 44$  s gastos caçando as baratas,  $575 \pm 68$  s gastos manuseando e ingerindo as baratas (contato) e outros comportamentos como se limpar, beber água, comer ração levaram  $75 \pm 33$  s (Figura 10).



**Figura 10** – Análise Comportamental – A análise comportamental mostra a latência para início da caça (Latência), tempo gasto com a caça (Caçar), tempo gasto em contacto com as presas (Contato), tempo gasto com outros comportamentos (Outros) e duração total da sessão de comportamento predatório (Duração) de ratos com vibrissas intactas (Vib) e 48 horas após remoção das vibrissas (VibX) (n=12). Os dados foram expressos como Média  $\pm$  Erro padrão. Foi aplicado o Teste estatístico Wilcoxon para amostras pareadas.

#### 4.1.2. Descrição comportamental observada em nossos experimentos, em animais com vibrissas removidas (VibX).

Após expressar as respostas comportamentais semelhantes ao descrito acima, os ratos tiveram suas vibrissas removidas (VibX). Passadas 48 horas da remoção das vibrissas os ratos eram transferidos para as gaiolas experimentais, onde permaneciam por 2 horas, e então eram introduzidas as cinco baratas.

Constatamos que os ratos cujas vibrissas foram removidas (VibX) são capazes de predar de forma eficaz, executando a mesma sequência básica descrita anteriormente para animais com as vibrissas intactas e levando aproximadamente o mesmo tempo para predar as 5 baratas. Esses animais levaram  $993 \pm 257$  s para predar as cinco presas, sendo  $209 \pm 97$  s gastos caçando as baratas (caçar),  $596 \pm 90$  s gastos manuseando e ingerindo as

baratas (contato), e  $189 \pm 97$  s gastos em outros comportamentos (Figura 10). A estes dados foi aplicado o teste estatístico de Wilcoxon para amostras pareadas, com nível de significância de  $p < 0,05$ , sendo que para nenhuma destas variáveis foi observada diferença estatisticamente significativa.

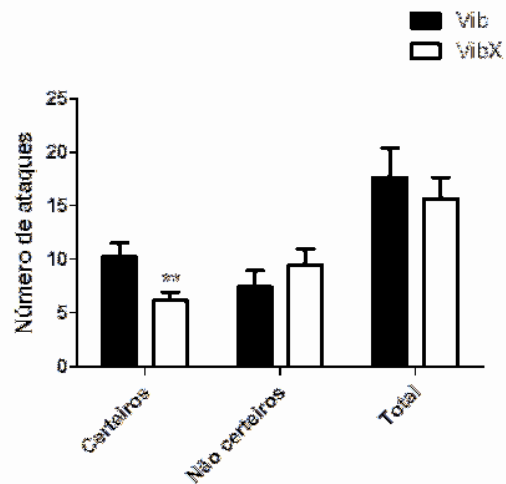
É muito interessante nesses ratos a orientação e detecção das presas pelo olfato. Observamos que os ratos sem vibrissas (VibX) cheiravam a gaiola comportamental uma grande parte do tempo.

Esses ratos (VibX) também deixavam restos de baratas como pernas, asas e carcaça, sempre voltando para comê-los, no intervalo entre capturas. E, algumas vezes matavam mais de uma barata para depois consumirem-nas. Já mesmo não restando baratas vivas na gaiola experimental os animais permaneciam por volta de 20 minutos procurando-as e depois iam dormir.

Apesar de o teste não-paramétrico para amostras pareadas de Wilcoxon não ter indicado alterações nas variáveis ilustradas na Figura 10, pudemos notar algumas alterações no desempenho do comportamento predatório induzidas pela inativação do sistema sensorial das vibrissas. Observamos que aparentemente não tinham a mesma desenvoltura nos ataques às baratas como mais visivelmente observávamos nos animais com vibrissas intactas (Vib). Muitas vezes os ataques iniciados não têm continuidade na medida em que a presa rapidamente foge afastando-se do predador. Muitas vezes, após uma captura, a presa escapa e o rato inicia outro ataque na tentativa de recapturá-la, entretanto, o rato sem vibrissas (VibX) nem sempre apresenta desenvoltura em perseguí-la. Esta interrupção se deve, presumivelmente, à falta informação tátil que as vibrissas forneceriam caso estivessem intactas.

Assim, optamos por fazer uma análise abordando outros aspectos do comportamento predatório, tais como o número ataques realizados sobre as presas: ataques certos, ataques não certos e número total de ataques.

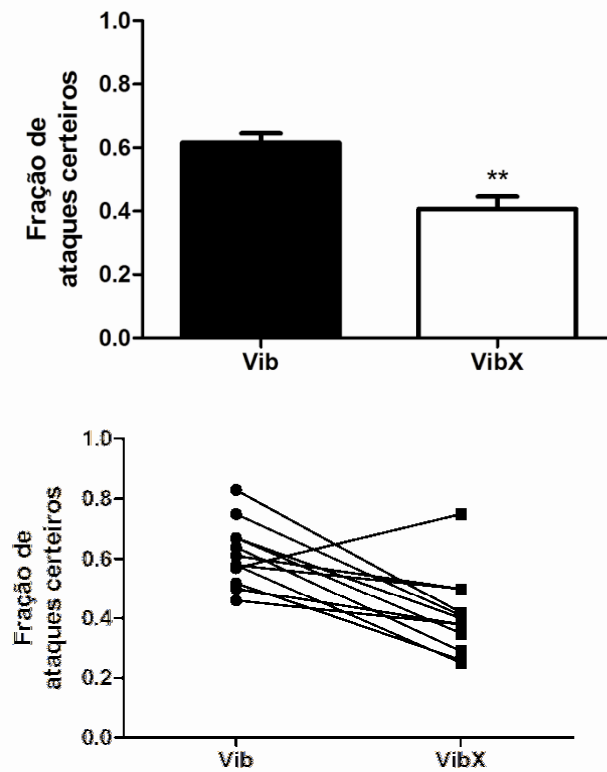
Observamos que os animais após a remoção de suas vibrissas (VibX) apresentaram uma redução do número de ataques certos em 40%. Aplicamos o teste estatístico de Wilcoxon para amostras pareadas e verificamos que a remoção das vibrissas reduziu o número de ataques certos de forma estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ), conforme ilustrado na Figura 11. Não observamos diferenças estatisticamente significativas com relação ao número de ataques não certos e totais em consequência da remoção das vibrissas (ou seja,  $P > 0,05$  para todas as outras variáveis).



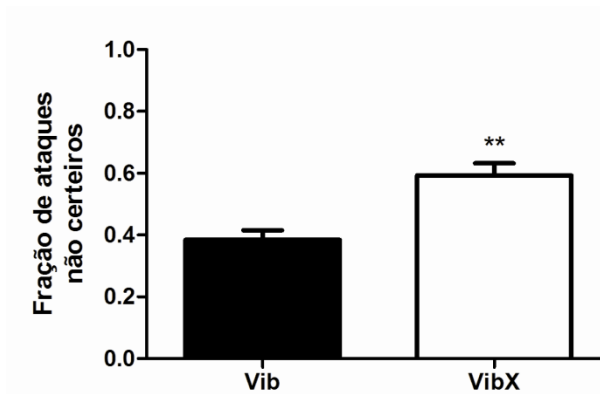
**Figura 11** – Análise Comportamental – A análise comportamental mostra o número de ataques certos, ataques não certos e número total de ataques de ratos com vibrissas intactas (Vib) e 48 após remoção das vibrissas (VibX) ( $n=12$ ) durante sessão de comportamento predatório. Os dados foram expressos como Média  $\pm$  Erro padrão. Foi aplicado o Teste estatístico Wilcoxon para amostras pareadas (\*\* difere significativamente,  $p < 0,01$ ).

As Figuras 12 e 13 ilustram, respectivamente, a taxa entre o número de ataques certos e não certos e o número total de ataques para animais antes (Vib) e após remoção das vibrissas (VibX).





**Figura 12** – Análise Comportamental – Gráfico Superior: A análise comportamental mostra a taxa entre o número de ataques certos e o número total de ataques de ratos com vibrissas intactas (Vib) e 48 após remoção das vibrissas (VibX) (n=12) durante sessão de comportamento predatório. Os dados foram expressos como Média  $\pm$  Erro padrão. Foi aplicado o Teste estatístico Wilcoxon para amostras pareadas (\*\* difere significativamente,  $p < 0,01$ ). Gráfico Inferior: Análise comportamental ilustrando valores de cada indivíduo.

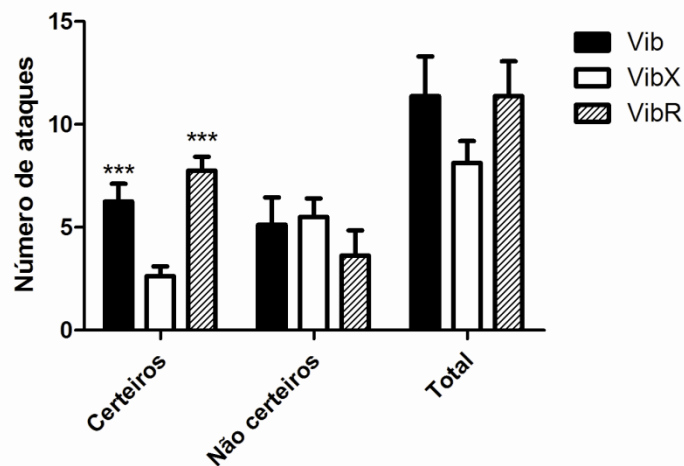


**Figura 13** – Análise Comportamental – Gráfico Superior: A análise comportamental mostra a taxa entre o número de ataques não certos e o número total de ataques de ratos com vibrissas intactas (Vib) e 48 após remoção das vibrissas (VibX) (n=12) durante sessão de comportamento predatório. Os dados foram expressos como Média  $\pm$  Erro padrão. Foi aplicado o Teste estatístico Wilcoxon para amostras pareadas (\*\* difere significativamente,  $p < 0,01$ ). B) Gráfico Inferior: Análise comportamental ilustrando valores de cada indivíduo.

#### 4.1.3. Descrição comportamental observada em nossos experimentos, em animais com vibrissas reconstituídas (VibR); experimento # 2.

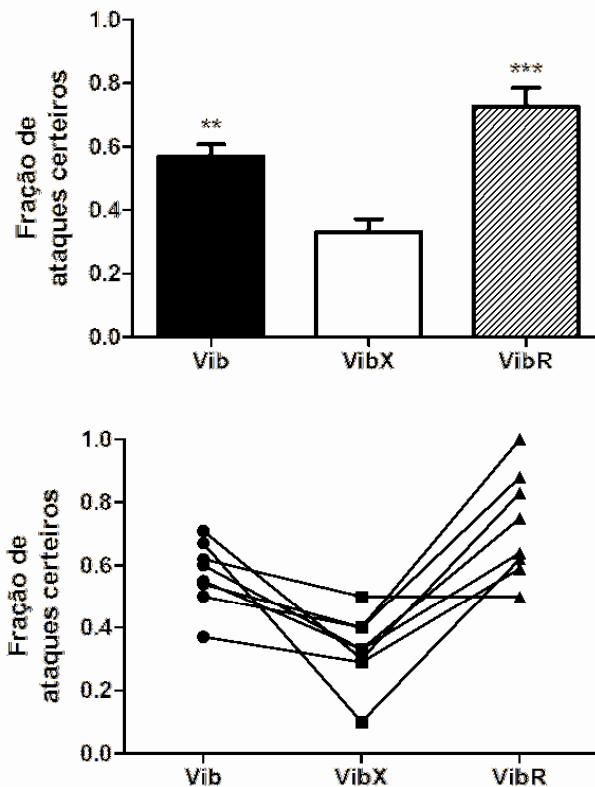
No experimento # 2, o comportamento predatório observado em animais nas condições Vib e VibX foi semelhante àquele descrito no experimento # 1. Os animais sem vibrissas (VibX) apresentaram uma redução do número de ataques certos após 48 horas da remoção de suas vibrissas e quando suas vibrissas estavam regeneradas (VibR) (após 30 dias) eles apresentaram um re-estabelecimento do número de ataques certos quando expostos as presas (Figura 14), e mostraram uma acuidade na realização dos ataques tão boa quanto, ou até melhor que, na condição Vib.

Aplicamos o teste estatístico de ANOVA para variáveis com medidas repetidas seguida do pós-teste Tukey-Kramer e verificamos que a redução estatisticamente significativa no número de ataques certos em animais na condição VibX, previamente observada no Experimento 1. Adicionalmente, este teste estatístico confirma a recuperação da acuidade dos ataques certos dos animais VibR (Figura 14).



**Figura 14** – Análise comportamental - A análise comportamental mostra o número de ataques certos, ataques não certos e número total de ataques de ratos ( $n = 8$ ) com vibrissas intactas (Vib), 48 horas após remoção das vibrissas (VibX) e após regeneração das vibrissas em 30 dias (VibR), durante sessão de comportamento predatório. Os dados foram expressos como Média  $\pm$  Erro padrão. Foi aplicado o Teste estatístico ANOVA para medidas repetidas seguido do pós-teste Tukey-Kramer (\*\*\*) difere significativamente do grupo VibX,  $p < 0,001$ ).

A Figura 15 ilustra a taxa entre o número de ataques certos e não certos e o número total de ataques para animais antes (Vib) e após remoção das vibrissas (VibX) e com as vibrissas reconstituídas (VibR). É possível notar a redução na fração de ataques certos causada pela remoção, assim como a melhora no desempenho proporcionada pela regeneração das vibrissas.



**Figura 15** – Análise comportamental – Gráfico Superior: A Análise comportamental mostra a taxa entre o número de ataques certos de ratos com vibrissas intactas (Vib) (n=8), 48 horas após remoção das vibrissas (VibX) e após regeneração das vibrissas em 30 dias (VibR), durante sessão de comportamento predatório. Os dados foram expressos como Média  $\pm$  Erro padrão. Foi aplicado o Teste estatístico ANOVA para medidas repetidas seguido do pós-teste Tukey-Kramer (\*\* difere significativamente do grupo VibX,  $P < 0,01$ ; \*\*\* difere significativamente do grupo VibX,  $p < 0,001$ ). Gráfico Inferior: Análise comportamental ilustrando valores de cada indivíduo.

## **4.2. Imunorreatividade à proteína Fos em encéfalos de ratos em estudo envolvendo remoção das vibrissas**

Em nossos experimentos verificamos a marcação da proteína Fos em 3 grupos comportamentais, ilustrados nas Figura 16, 17 e 18: animais habituados às condições experimentais e ao experimentador (Habitado), que não tiveram contacto com baratas; animais com vibrissas que predaram baratas (Vib); e animais cujas vibrissas foram removidas após realizarem a predação e então foram novamente expostos as baratas em 48 horas (VibX).

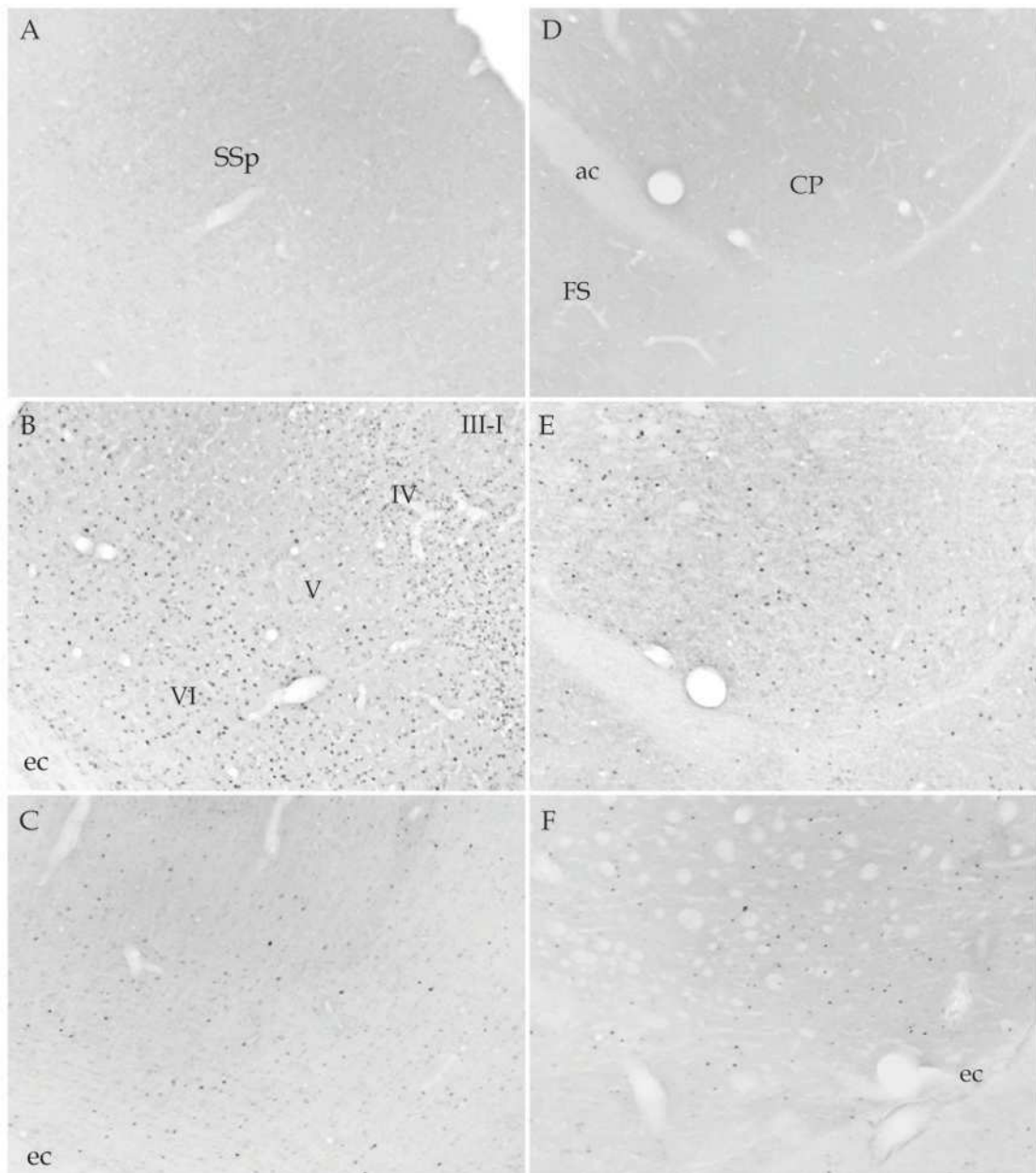
Analisamos a expressão de proteína Fos em setores encefálicos sabidamente ativos durante o comportamento predatório (Comoli e Canteras, 2000; Comoli et al., 2005) tais como SSp e Córtex Olfativo (Córtex Piriforme, PIR), Amígdala, Caudo-putâmen (CP), e CS, que é nosso principal alvo de estudo.

Como era esperado, observamos ausência de proteína Fos na área de representação das vibrissas (Barrel Field, Camada IV do Córtex Somatossensorial), dos animais habituados (Figura 16A) e redução massiva daqueles cujas vibrissas foram removidas (VibX) (Figura 16C), em contraste com a intensa marcação dessa região dos ratos que predaram com vibrissas intactas (Vib) (Figura 16B).

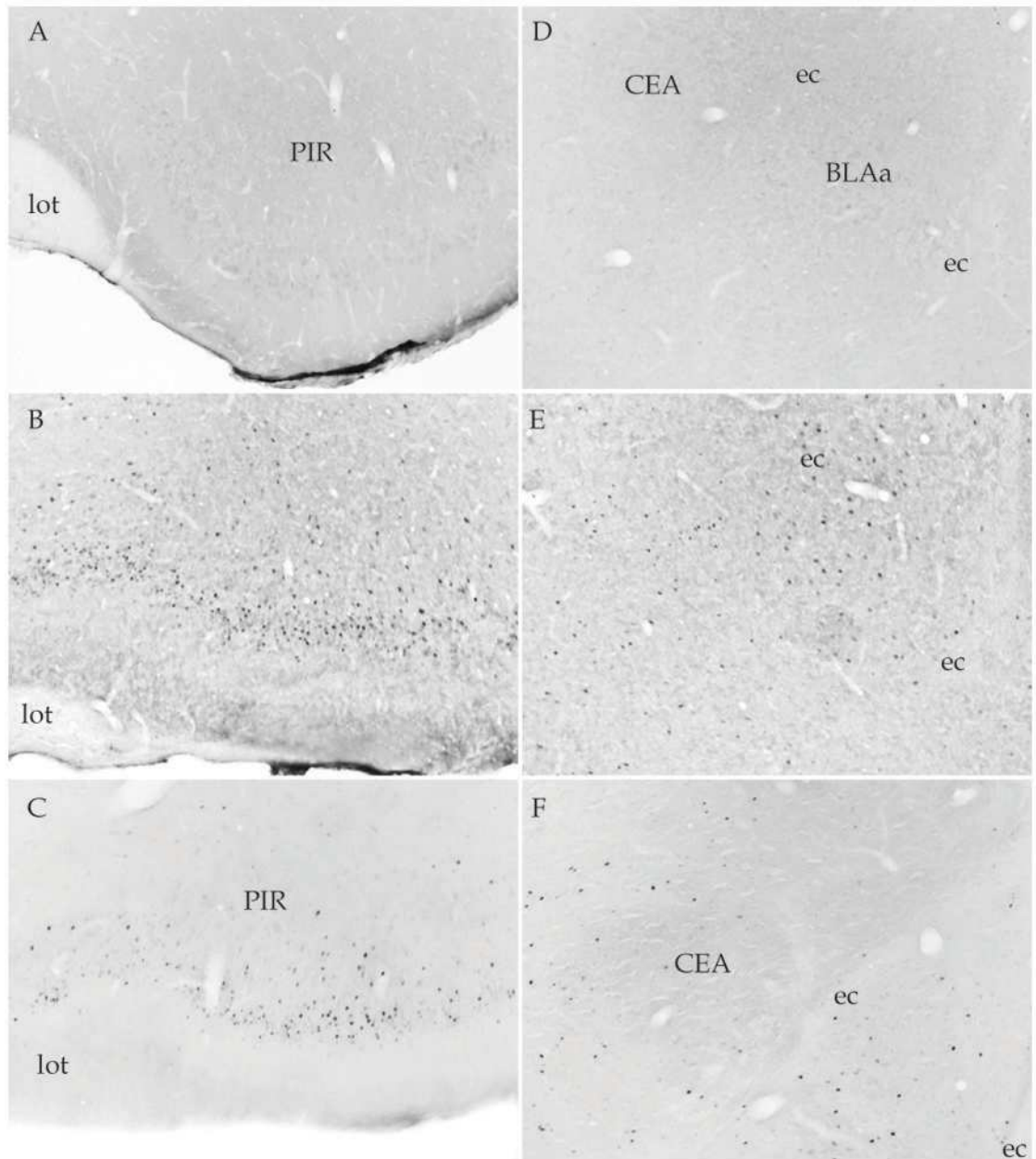
Observamos uma marcação intensa no Córtex Piriforme tanto nos animais com vibrissas (Vib) (Figura 17B) e animias sem vibrissas (VibX) (Figura 17C), em contraste com a ausência de marcação nessa região nos animais habituados (Figura 17A). Interessantemente notamos que o olfato parece ser um sentido muito importante no comportamento predatório.

Na Amígdala observamos imunorreatividade à proteína Fos nos Núcleos Cortical Anterior, Central (Figura 17E e F), Basolateral Anterior (Figura 17E e F) e Posterior, e Área de Transição Pós-piriforme dos animais com vibrissas (Vib) e sem vibrissas (VibX), em contraste com a ausência de marcação nessas regiões de animais habituados (Figura 17D).

Ainda observamos núcleos celulares marcados na região do estriado ventral (FS) e setores ventrais rostrais do Caudo-putâmen (Figura 16E e F) nos animais com (Vib) e sem vibrissas (VibX). Não observamos marcação nessas regiões de animais habituados (Figura 16D).



**Figura 16** – Fotomicrografia de cortes frontais do encéfalo de rato imunorreagidos para detecção da proteína Fos. Expressão da proteína Fos, no Córtex Somestésico Primário (SSp) de animal habituado (A), Vib (B) e VibX (C); Expressão da proteína Fos, no Caudo-putâmen e estriado ventral (FS) de animal habituado (D), Vib (E) e VibX (F) (x100). CP = Caudo-Putâmen, ec = cápsula externa, ac: comissura anterior; I-VI (camadas do córtex).



**Figura 17** – Fotomicrografia de cortes frontais do encéfalo de rato imunorreagidos para detecção da proteína Fos. Expressão da proteína Fos, no Córtex Piriforme (PIR) de animal habituado (A), Vib (B) e VibX (C); Expressão da proteína Fos, na Amígdala de animal habituado (D), Vib (E) e VibX (F) (x100). lot: trato olfativo lateral; ec: cápsula externa; BLAa: Núcleo Basolateral Anterior da Amígdala; CEA: Núcleo Central da Amígdala; PIR: Córtex Piriforme.

No nosso estudo, o setor de maior interesse foi o CS, em especial os níveis rostrocaudais intermediários em que observamos um maior desenvolvimento do CS (AP  $\cong$  6.0 mm). Sabidamente, em estudos prévios de lesões neuroquímicas bilaterais nesse setor foram observados déficits comportamentais durante a expressão do comportamento predatório (Comoli e Canteras, 2000).

Verificamos que os animais habituados não apresentam imunorreatividade à proteína Fos na região do CSI (Figura 18C-D). Em contraste, observamos imunorreatividade à proteína Fos nessa região dos dois grupos de animais que predaram baratas: nos ratos com vibrissas intactas (Vib) (Figura 18E-F) e naqueles cujas vibrissas foram removidas (VibX) (Figura 18G-H).

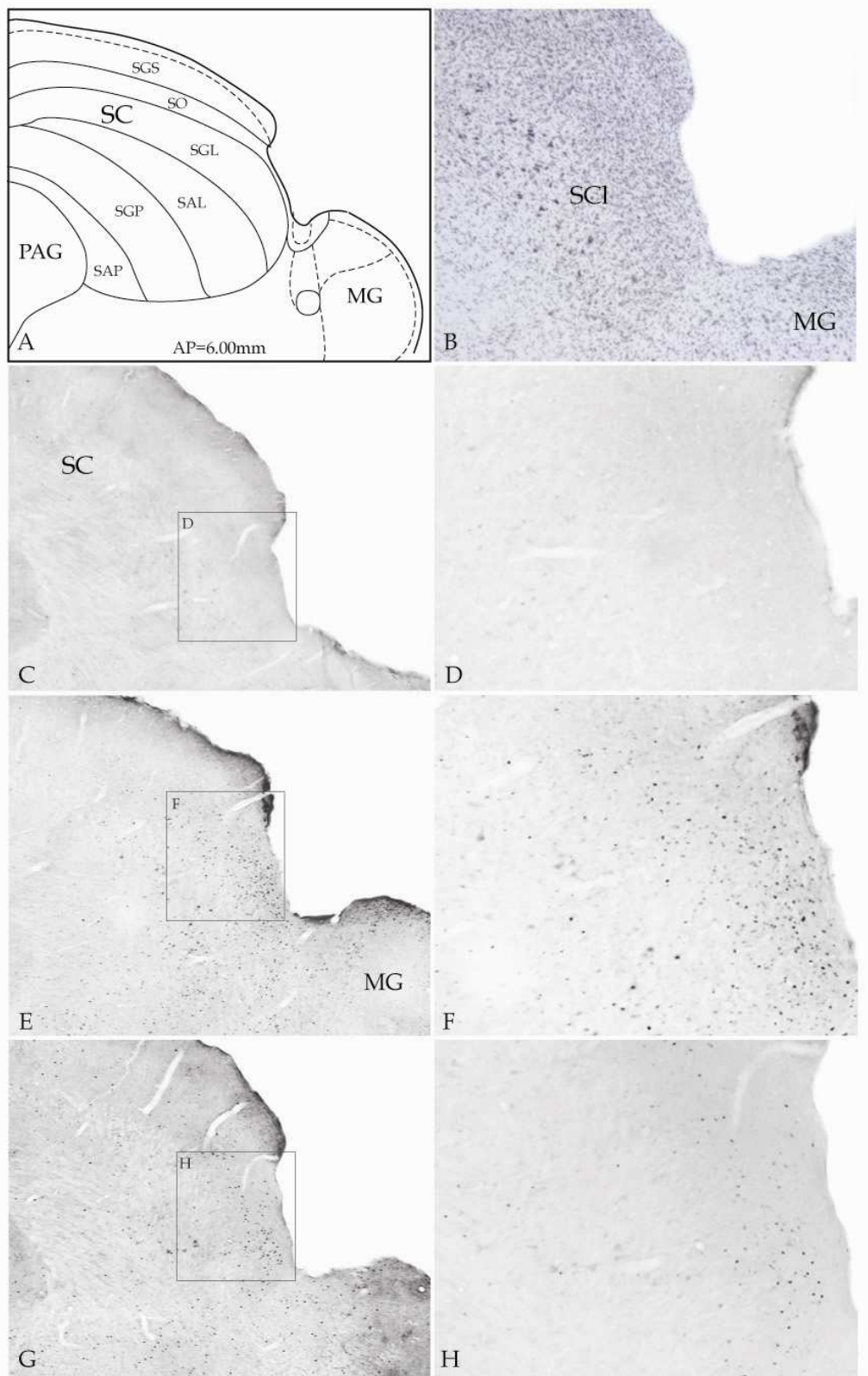
Em análise microscópica observamos um padrão semelhante de marcação da proteína Fos na extremidade lateral da camada intermediária cinzenta do CS de ratos com vibrissas intactas (Vib) (n = 5) e animais sem vibrissas (VibX) que predaram insetos (n = 5) (AP  $\cong$  6.00mm) (Figura 19B e C). Com relação à extremidade lateral da camada intermediária branca do CS observamos um padrão aparentemente reduzido nos animais sem vibrissas (Figura 19C). Não foi observada marcação com Fos nesses setores em ratos habituados que não predaram (n = 5) (Figura 19A).

Assim sendo, para realizarmos uma estimativa do número de núcleos celulares marcados com proteína Fos, em animais com (Vib) e sem vibrissas (VibX), foram selecionados três cortes em níveis intermediários do CS por encéfalo, sendo cortes adjacentes no mesmo compartimento (distantes 120  $\mu$ m entre si) (AP  $\cong$  6.00mm).

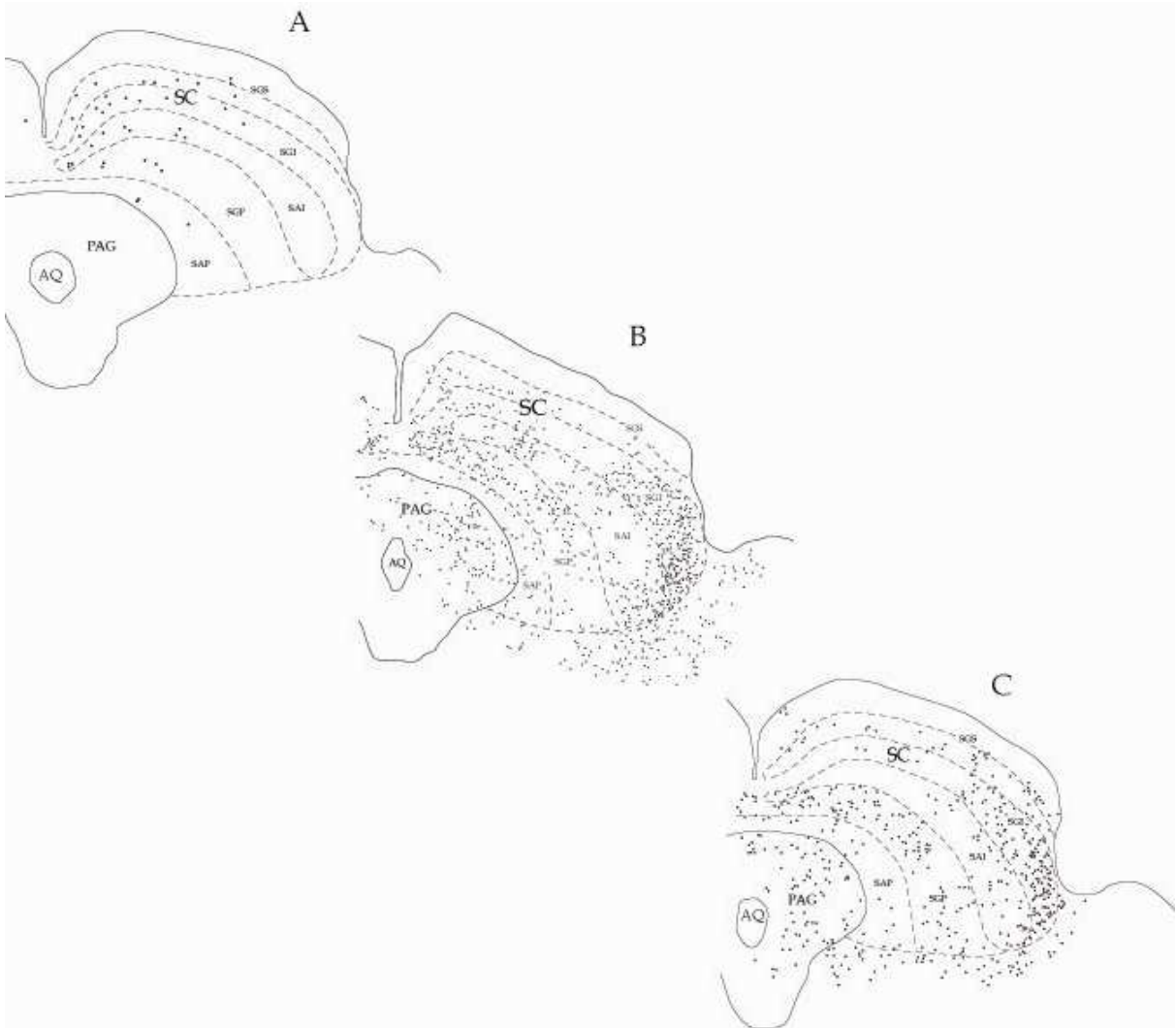
Nossos resultados foram analisados com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, sendo considerados significativos resultados para os quais  $p < 0,05$ . Não observamos diferenças significativas no padrão de distribuição de núcleos marcados com proteína Fos na camada cinzenta intermediária do CS (SGI) (Figura 20) entre animais com vibrissas intactas (Vib) e aqueles cujas vibrissas foram removidas (VibX).

Nossos resultados revelam diferenças significativas no padrão de distribuição de núcleos marcados com proteína Fos na camada branca intermediária do CS (SAI) (Figura 21) entre animais com vibrissas intactas (Vib) e aqueles cujas vibrissas foram removidas (VibX).

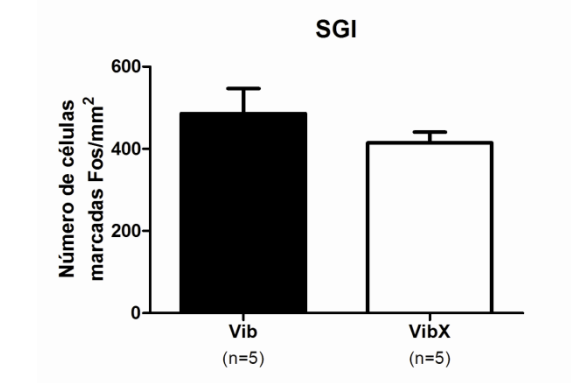




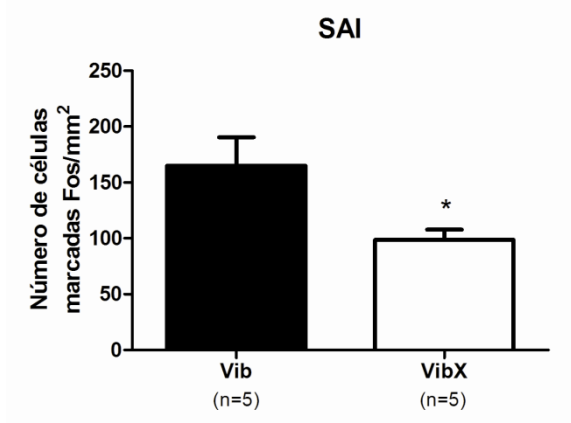
**Figura 18** – Fotomicrografia de cortes frontais do encéfalo de rato. A) Representação esquemática do CS (AP  $\cong$  6.00mm). B) Coloração para observação da citoarquitetura do CS, através do método de Nissl (coloração de tionina; x100). C-H) Expressão da proteína Fos, marcadora de atividade neural no CSI (x40) ; de um animal habituado (C), de um rato com vibrissas (Vib) (E) e um rato sem vibrissas (VibX) (G). À direita (D, F e H), detalhe da porção lateral das camadas intermediárias do CS (x100). (MG: núcleo geniculado medial do tálamo; PAG: substância cinzenta periaquedutal; SAL: camada branca intermediária; SAP: camada branca profunda; SC: Colículo Superior; SCI: porção lateral das camadas intermediárias do Colículo Superior; SGI: camada cinzenta intermediária; SGP: camada cinzenta profunda; SGS: camada cinzenta superficial; SO: camada óptica).



**Figura 19:** Representações esquemáticas de cortes frontais do cérebro na região do CS ( $AP \cong 6.00\text{mm}$ ) de ratos imunoreagidos para detecção da proteína Fos em animais habituados (A); animais com vibrissas intactas (Vib) (B); e animais sem vibrissas (VibX). (C). (SC: Colículo Superior; SAI: camada branca intermediária; SAP: camada branca profunda; SGI: camada cinzenta intermediária; SGP: camada cinzenta profunda; SGS: camada cinzenta superficial; SO: camada óptica; PAG: substância cinzenta periquedutal ; e AQ: aqueduto cerebral).



**Figura 20** – O histograma mostra a densidade de células imunorreativas à proteína Fos na extremidade lateral da camada cinzenta intermediária (SGI) do CS em ratos com as vibrissas íntegras (Vib) e 48 horas após a remoção das vibrissas (VibX) (n=5 para cada grupo). Os valores representam o número de células imunorreativas à proteína Fos/mm<sup>2</sup>. Os dados foram expressos como Média ± Erro padrão. Foi aplicado o Teste estatístico de Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ).



**Figura 21** – O histograma mostra a densidade de células imunorreativas à proteína Fos na extremidade lateral da camada branca intermediária (SAI) do CS em ratos com as vibrissas íntegras (Vib) e 48 horas após a remoção das vibrissas (VibX) (n=5 para cada grupo). Os valores representam o número de células imunorreativas à proteína Fos/mm<sup>2</sup>. Os dados foram expressos como Média ± Erro padrão. Foi aplicado o Teste estatístico de Mann-Whitney (\*difere significativamente do grupo Vib,  $p < 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Iniciaremos a nossa discussão com algumas considerações sobre o uso da proteína Fos como marcadora de atividade neuronal para mapear funcionalmente circuitos neurais.

Em seguida faremos a discussão dos nossos resultados.

### 5.1. Considerações metodológicas sobre o uso da proteína Fos como marcadora de atividade neuronal

A proteína Fos é uma fosfoproteína, produto da expressão proteica do gene *c-fos*. Considerando-se que a atividade neuronal pode induzir diversas alterações na expressão gênica da célula pós-sináptica, temos que dentre os genes a terem sua expressão alterada nestas circunstâncias estão os proto-oncogenes, também conhecidos como genes de ação precoce ou imediata. O gene *c-fos* é um proto-oncogene, cujo produto de expressão gênica (proteína Fos) se liga ao DNA no núcleo das células. Os proto-oncogenes participam da codificação de proteínas que atuam, por exemplo, como fatores de crescimento celular, receptores de membrana, proteína G e fatores de transcrição (Curran e Morgan, 1995), que têm a função comum da participação na transmissão da comunicação de processos intercelulares, bem como intracelulares (Curran, 1992). Na maioria das células, os níveis basais mRNA do gene *c-fos*, bem como a sua expressão proteica, são relativamente baixos e quando ativados, como por exemplo pela estimulação fisiológica de neurônios primários sensoriais, ocorre a sua expressão (Cohen e Curran, 1989).

Morgan e Curran (1989) sugerem que a proteína Fos funciona como um terceiro mensageiro nuclear que liga sinais extracelulares de curta duração com alterações na função celular em longo prazo através da regulação da expressão de genes específicos. Esta proteína se liga à proteína jun, formando um complexo heterodimérico fos-jun que por sua vez se liga a sítios específicos do DNA, conhecidos como AP-1 (Curran e Franza, 1988) e passam a regular a expressão de alguns neurotransmissores, receptores e outras

moléculas (Morgan e Curran, 1991,1995), podendo, desta forma, provocar mudanças nos receptores de membrana, nos canais iônicos ou na expressão de um neurotransmissor.

A detecção imunohistoquímica da proteína Fos no sistema nervoso central é utilizada como um importante marcador de atividade neuronal, podendo ser utilizada para mapear funcionalmente circuitos neurais (Dragunow e Robertson, 1988; Morgan et. al., 1988; Dragunow e Faull,1989; Comoli e Canteras, 1998; 2000; Comoli et al., 2005). Todavia devemos ressaltar que essa técnica sofre várias limitações.

Diversos estudos têm mostrado que, independente do estímulo utilizado pra induzir ativação neural, alguns sítios do sistema nervoso central não expressam a proteína Fos (Dragunow e Faull, 1989, Wisden et al, 1990). Por outro lado, após um dado estímulo, os neurônios ativados que não expressam a proteína Fos podem utilizar outros fatores de transcrição, tais como *jun* e *krox*, ou nestas células os mensageiros intracelulares necessários para regular a expressão do gene *c-fos* podem não terem sido particularmente mobilizados (Sheng e Greenberg, 1990). Feitas essas ressalvas podemos discutir os resultados relativos à expressão da proteína Fos no cérebro de ratos durante a execução do comportamento predatório em ratos.

## **5.2. Implicações funcionais do sistema sensorial das vibrissas no comportamento predatório em ratos**

Os comportamentos visuo-motores e reconhecimento visual de objetos têm sido estudados em detalhes, enquanto pouco se sabe sobre representação tátil de objetos. Na tentativa de entender o comportamento de orientação tátil Anjum et. al. (2006) avaliaram a captura de grilos por musaranhos etruscos selvagens (*Suncus etruscus*), um dos menores mamíferos. Os musaranhos, animais de alta taxa metabólica e hábito noturno, são forçados a capturar e matar uma grande quantidade de presas no escuro. Os autores concluíram, em acordo com as conclusões originais de Gilbson (1962), que na captura de presas por musaranhos etruscos a percepção tátil é baseada no tato ativo, uma vez que suas vibrissas

são altamente móveis durante o ataque e o contato com a presa resulta de movimentos rítmicos ativos das vibrissas para frente e para trás, e rápidos movimentos proeminentes da cabeça; e em menor extensão de movimentos translacionais do corpo. Com a remoção das vibrissas nesses pequenos mamíferos houve uma queda em 52% dos ataques.

Mediante nossas observações comportamentais iniciais de predação em ratos com vibrissas intactas consideramos que o deslocamento da presa, assim como o contacto das vibrissas eram estímulos fundamentais para desencadear a predação, e que esses estímulos poderiam estar envolvidos com o aumento da marcação de Fos no CSI na predação, uma vez que o CSI recebe aferências sensoriais de diversas estruturas relacionadas à sensibilidade da face e das vibrissas.

Dessa forma, inicialmente, acreditávamos que a remoção das vibrissas poderia resultar em déficits comportamentais na caça de baratas em ratos, e revelar dados anatômicos muito relevantes referentes ao papel do CS na integração de informações somatossensoriais, de outras modalidades sensoriais e motoras no contexto do comportamento predatório; e ainda revelar informações a respeito da integração da informação sensorial das vibrissas em outros sistemas neurais que podem ser alvos de comunicação do CS, tais como sistemas estriatais dos gânglios da base; que contribuem com a elaboração e planejamento motor da predação.

Assim, realizamos experimentos comportamentais com ratos com vibrissas intactas (Vib), ratos cujas vibrissas foram removidas (VibX) e posteriormente após a regeneração das vibrissas (30 dias após terem sido removidas) (VibR); associando a marcação da proteína Fos ao comportamento predatório em ratos com vibrissas intactas (Vib) e ratos com vibrissas removidas (VibX).

Obtivemos dados comportamentais de um grupo de 12 animais para compararmos aspectos gerais do comportamento predatório antes e após remoção das vibrissas (experimento # 1), em que avaliamos elementos comportamentais gerais como latência, caça, contacto, duração do comportamento e outros, englobando autolimpeza, ingestão de

água, dormir, etc. Nossas observações do comportamento predatório em ratos com vibrissas, no nosso laboratório, sugeriam que na captura da presa a percepção tátil poderia ser baseada na sensação passiva da deflexão das vibrissas causada pelo movimento da presa e não no tato ativo como nos musaranhos selvagens. Porém, interessante, os ratos sem vibrissas foram capazes de capturar, segurar e manusear as presas, realizando sequências de movimentos estereotipados, e consumirem-nas, ou seja, sob os aspectos gerais do comportamento obtivemos que mesmo sem as vibrissas os ratos desempenham comportamento predatório satisfatório que resulta em captura e consumo das presas. Inicialmente pensamos que o comportamento, que sob aspectos gerais foi satisfatório, poderia ser decorrente de informações olfativas, uma vez que o rato apresenta esse sistema sensorial bastante aguçado; ou até mesmo de informações visuais que também julgamos poder ser importante para desencadear o comportamento predatório.

Aparentemente nossos dados comportamentais revelam que as macrovibrissas parecem não serem elementos essenciais para o comportamento predatório dos ratos. Entretanto, numa análise mais detalhada do comportamento, observamos que animais sem vibrissas aparentemente não tinham a mesma desenvoltura nos ataques às baratas como mais visivelmente observávamos nos animais com vibrissas intactas. Muitas vezes os ataques iniciados não tinham continuidade na medida em que a presa rapidamente fugia afastando-se do predador. Ainda, muitas vezes, após uma captura, a presa escapava e o rato iniciava outro ataque na tentativa de recapturá-la, entretanto, nem sempre apresentava desenvoltura em perseguí-la. Dessa forma nos propuzemos a avaliar mais detalhadamente os ataques realizados por ratos antes e após a remoção das vibrissas, de modo que quantificamos o número de ataques certos em que num único movimento preciso o rato agarra a presa e a traz para junto de si; ataques não certos que requerem uma sequência de movimentos correccionais até que o rato consiga agarrar a presa; e o número total de ataques, durante uma sessão comportamental de 20 minutos.

Observamos que os animais sem vibrissas apresentaram uma redução significativa do número de ataques precisos, em que num único movimento o rato era capaz de manter as presas em suas patas dianteiras ou na boca (ataques certos) e trazê-las junto de si. Observamos, também, que após sequências de ataques imprecisos (não certos) que são efetuados tanto pelos ratos com vibrissas intactas (Vib) ou após remoção das vibrissas (VibX) os ratos acabam sendo capazes de manter as presas em sua posse e ingerí-las.

É importante mencionar que o padrão de resposta dos animais sem vibrissas (VibX) é bem distinto dos animais que foram lesados bilateralmente com NMDA (Comoli e Canteras, 2000). Os animais lesados bilateralmente no CSI não conseguiam agarrar e manter as presas em suas patas ou na boca e ingerí-las, uma vez que esses animais apresentaram movimentos apráxicos da musculatura orofacial e das patas dianteiras, daí a dificuldade de controlarem a abertura e fechamento do maxilar inferior e das patas, portanto, não serem capazes de abocanhar efetivamente as presas; e também não agarrá-las com as patas dianteiras, e manuseá-las propriamente; conseqüentemente as presas escapavam com facilidade após várias tentativas de capturá-las, resultando no fracasso da consumação das mesmas. Aparentemente tais alterações comportamentais são sugestivas de déficits motores. Consideramos, ainda, que esses animais podem apresentar déficits sensoriais sérios, uma vez que também demonstram falta de orientação em relação ao deslocamento das presas. Frequentemente, mesmo se aproximando das presas, esses animais não detectam os movimentos de deslocamento das presas e elas passam despercebidas no seu campo visual.

Nesse sentido é importante considerar a importância das macrovibrissas na investigação espacial para obtenção de informação da distância dos objetos no ambiente, associados aos possíveis movimentos rostrocaudais das vibrissas que permitem um escaneamento do espaço para orientação e detecção de objetos (ou seus contornos) (Bretch et. al., 1997), no caso a detecção da localização das presas, que se capturadas seriam reconhecidas pelas microvibrissas; ou mesmo na geração de movimentos



translacionais do corpo que são importantes para uma boa desenvoltura durante ataques e perseguições as presas.

Também observamos em nossos experimentos (experimento # 2) com um grupo de 8 animais, que quando as vibrissas cresciam e atingiam o comprimento original eles recuperavam significativamente os ataques certos as presas e melhoravam a desenvoltura em perseguir as presas. Esses resultados mostram que de fato o uso das vibrissas contribui para a qualidade dos ataques predatórios.

Nossos dados comportamentais sugerem fortemente que as vibrissas apesar de não serem fundamentais para desencadear o comportamento predatório, são importantes para maior eficácia ou direcionamento para a ocorrência de ataques precisos durante o comportamento predatório, uma vez que elas podem ser vistas como órgãos sensoriais de localização de objetos e detecção a certas distâncias, fornecendo informações espaciais que podem levar à localização espacial de objetos a serem capturados (ver Bretch et. al., 1997).

### **5.3. Dados anatômicos e implicações funcionais no comportamento predatório em ratos**

Em nossos experimentos observamos o padrão de marcação da proteína Fos durante o comportamento predatório em ratos com vibrissas intactas (Vib) e ratos sem vibrissas (VibX). Notamos diversas semelhanças no padrão geral de marcação da proteína Fos em diversos setores Corticais tais como Córtex Piriforme, Córtex Visceral, Amígdala e Caudo-Putâmen em animais com e sem vibrissas.

A intensa marcação no Córtex Visceral pode estar relacionada ao fato do animal ingerir baratas ou ainda estar relacionada com mecanismos antecipatórios envolvidos na ingestão das mesmas.

Interessantemente no sistema amigdaliano observamos considerável marcação de Fos nos Núcleos Cortical Anterior, Central, Basolateral Anterior e Posterior, e Área de

Transição Pós-piriforme. Tais setores amigdalianos apresentam conexões entre si e parecem compor um circuito instrínseco na amígdala que estaria particularmente envolvido com a ingesta ou mecanismos antecipatórios relacionados ao ato alimentar (Petrovich et al, 1996). Esse sistema amigdaliano é aferentado por informações olfativas provenientes do Córtex Olfativo, bem como informações gustativas e viscerais provenientes da Área Parabraquial no tronco e pelo Córtex Visceral (Saper e Loewy, 1980; Bernard et al., 1993; Krukoff et al., 1993; Yasui et al., 1991). Estudos indicam que a Área Parabraquial e o Córtex Visceral integram o comportamento alimentar e, em particular, o processamento de informações relativas aos aspectos hedônicos envolvidos no ato alimentar (Merali et al., 1998; Hajnal et al.1998; Pomonis et al., 2000). É importante mencionar que a barata tem cheiro bastante particular e pode exercer efeito motivacional no desencadeamento do comportamento predatório.

Julgamos que a intensa ativação do Córtex Somestésico em ratos com vibrissas (Vib) seja devido ao fato do animal utilizar muito o senso tátil (vibrissas) e manipular cuidadosamente a presa durante o ato predatório. Como era esperado, observamos grande redução na marcação de Fos na área de representação das vibrissas no Córtex Somestésico Primário (SSp) dos animais cujas vibrissas foram removidas (VibX). A pequena marcação observada no SSp desses animais pode estar relacionada à sensibilidade do focinho e região da boca.

Ainda observamos marcação em setores estriarais como o Fundo do Estriado e setores ventrolaterais do Caudo-putâmen (CPvl). Esses setores podem estar fortemente relacionados à organização da seqüência de ações estereotipadas observada na predação. Animais com lesões temporárias no estriado ventrolateral atacavam as presas apenas com a boca, sem assistência das patas dianteiras e falhavam em desencadear ataques certos com mordidas que matassem as presas de modo que essas permanecessem vivas e em movimento (dos Santos et. al, 2007). Os autores sugerem que o estriado ventrolateral implementa as ações estereotipadas vistas durante a captura e manuseio das presas.

De maior interesse no nosso estudo, observamos marcação de Fos no CSI de ratos com vibrissas intactas (Vib) e de ratos sem vibrissas (VibX), em especial nos níveis rostrocaudais intermediários em que observamos um maior desenvolvimento do CS (AP  $\cong$  6.0 mm).

Observamos um padrão semelhante de marcação da proteína Fos na extremidade lateral da camada intermediária cinzenta do CS (SGI) de ratos com vibrissas intactas (Vib) (n = 5) e animais sem vibrissas (VibX) que predaram insetos (n = 5). Com relação à extremidade lateral da camada intermediária branca do CS (SAI) observamos uma redução significativa da marcação de Fos nos animais sem vibrissas.

Considerando que a maior parte das aferências sensoriais das porções laterais do CS é proveniente das vibrissas e do focinho (Comoli e Canteras, 2000; Favaro e Comoli, 2009), e que as vibrissas não são fundamentais para desencadear o comportamento predatório sugerimos que a expressão de Fos observada na extremidade lateral da camada intermediária cinzenta do CS (SGI) de animais tanto com vibrissas quanto sem vibrissas possa estar mais relacionada ao componente motor do comportamento predatório.

Já uma redução significativa da marcação de Fos na camada intermediária branca do CS (SAI) nos animais sem vibrissas provavelmente reflete a retirada da condução e chegada de informações desse sistema sensorial até o CSI, uma vez que é sabido que esse setor colicular recebe aferências das vibrissas através das projeções indiretas através da ZI (Kolmac et al., 1998; Comoli e Canteras, 2000, Favaro e Comoli, 2009), núcleo reticular parvicelular (PARN), SSp (Comoli e Canteras, 2000; Hoffer et al., 2005; Favaro e Comoli, 2009), além de projeções diretas do núcleo Principal do Trigêmio (PrV) e do núcleo Espinhal do Trigêmio (SpV) (Killackey and Erzurumlu, 1981; Huerta et al., 1983; Comoli e Canteras, 2000; Favaro e Comoli, 2009).

Conseqüentemente a ausência de informação das vibrissas poderia resultar numa perda de integração sensório-motora entre as camadas branca e cinzenta do CSI que possivelmente retardaria a iniciação de movimento de orientação em roedores (Nicoletis

et.al., 1992) e conseqüentemente refletiria em diminuição de ataques precisos, uma vez que as vibrissas podem ser consideradas órgãos sensoriais de localização de objetos e detecção a certas distâncias, fornecendo informações espaciais que podem facilitar a localização espacial da presas e conseqüente direcionamento do movimento.

Os dados comportamentais e anatômicos de expressão de Fos no CSI de animais com e sem vibrissas referentes ao comportamento predatório, em conjunto, sugerem fortemente que a razão pela qual animais lesados bilateralmente com NMDA apresentavam déficits que impossibilitavam o sucesso na predação está possivelmente mais fortemente relacionada à perda do controle motor decorrentes da morte de células da extremidade lateral das camadas intermediárias, especialmente a cinzenta. A perda de células na camada branca do CS decorrente da lesão poderia estar envolvida com os possíveis déficits atencionais também observados nos animais lesados. Diferentemente, em animais sem vibrissas, a redução da atividade da camada intermediária branca, conseqüentemente deixa o rato menos provido de informações sensoriais espaciais que poderiam levar à localização espacial mais precisa das presas a serem capturadas.

#### **5.4. A importância do Colículo Superior na integração da informação sensorial e motora no comportamento predatório**

Há uma surpreendente similaridade na organização sensorial e motora do CS entre os mamíferos, sugerindo que este esquema de organização pode ter surgido antes do aparecimento dos mamíferos recentes. Estudos executados por Barry E. Stein (Gather & Stein, 1979; Stein, 1981) revelaram que o CS de mamíferos e o teto óptico de répteis são estruturas homólogas, e que o padrão topográfico encontrado representa um plano de representação sensorial que existiu nos antigos répteis e que foi retido durante a evolução para os mamíferos há mais de 180 milhões de anos.

Filogeneticamente, o CS é uma estrutura antiga, responsável pelas transformações requeridas para direcionar a fixação do olhar em direção de um evento biologicamente

significante ou inesperado, ou desviar o olhar desse evento (Dean et. al., 1989; Sparks, D.L., 1986; Stein e Meredith, 1993; Wurtz e Albano, 1980).

O CS engloba um número variável de camadas ricas em células e fibras alternantes (Kanaseki e Sprague, 1974; Reiner, 1994), apesar da distinção funcional se dar entre as camadas superficiais que recebem impulsos visuais retinotópicos organizados espacialmente; e as camadas profundas que recebem numerosos impulsos modulatórios multi-sensoriais e não-sensoriais (Casagrande et.al. 1972; Dean *et al.*, 1989; Stein e Meredith, 1993; Sefton e Dreher, 1995).

Estudos em gatos corroboram a idéia de que o deslocamento da presa e mesmo o contacto das vibrissas parecem ser estímulos fundamentais para desencadear o comportamento predatório, uma vez que experimentos eletrofisiológicos mostram neurônios, nas camadas profundas e intermediárias do CS, que disparam na presença de objetos que se deslocam no campo visual (Grantyn e Berthoz, 1985; Dean e Redgrave, 1984). Não temos evidência de registros eletrofisiológicos em ratos relacionando a sensibilidade das células do CSI ao deslocamento de objetos no campo visual, porém sabe-se que essas células tectais apresentam alterações eletrofisiológicas mediante estímulos sensoriais aplicados na face e nas vibrissas e parecem fazer parte de um sistema diferentemente responsivo a estímulo somático da região perioral e que pode ser usado para guiar objetos para a boca, como por exemplo “reflexo de morder” (Dean et al., 1989; Redgrave, 1990; Keay et al., 1990b); e que lesões na região do CS comprometeram a orientação destes animais a partir de estímulos multisensoriais (Burnett et al., 2004).

Ainda, registros eletrofisiológicos nas camadas intermediárias laterais e posteriores do CS sugerem que o CS faça parte da alça sensório-motora no sistema de vibrissas na mediação da orientação em associação as aferências provenientes do sistema trigeminal do rato (Hemelt e Keller, 2007). Ainda, em ratos, o CS é uma das poucas estruturas que exibem respostas sensoriais multimodais com latência consistente inferior a 70 ms e de

curta duração (Coizet et al., 2003), e ainda é sensível a eventos inesperados ou biologicamente significantes, como a presença de uma presa.

Informações aferentes que chegam ao CSI tais como aquelas provenientes da região de representação das vibrissas e do focinho parecem desempenhar um papel na iniciação de movimento de orientação em roedores (Nicoletis et al., 1992). Assim, acreditávamos que o deslocamento da presa e mesmo o contacto das vibrissas parecia ser um estímulo fundamental para desencadear o comportamento predatório; os dados anatômicos prévios sugeriam que esses estímulos também poderiam estar envolvidos com o aumento da expressão de Fos no CSI durante a predação. Nossos resultados mostram que os estímulos provenientes das vibrissas não são fundamentais e nem responsáveis por desencadear o comportamento predatório, mas por outro lado, elas são importantes para maior eficácia ou direcionamento para a ocorrência de ataques precisos durante o comportamento predatório, uma vez que elas podem ser vistas como órgãos sensoriais de localização de objetos e detecção a certas distâncias, fornecendo informações espaciais que podem levar à localização espacial de objetos a serem capturados (ver Bretsch et al., 1997). Os dados anatômicos mostram que informações sensoriais das vibrissas estão envolvidas com parte da ativação do CSI, em especial na camada intermediária branca (SAI).

Em roedores, uma distinção funcional pode ser possível entre os setores mediais (campo visual superior) e laterais (campo visual inferior) (Dean et al., 1989; Comoli e Cedraz-Merchez, 2009). Uma vez que nesses animais a maior parte dos estímulos ameaçadores surge de cima, a porção medial do CS parece estar mais envolvida com defesa, enquanto estímulos provenientes do campo visual inferior tipicamente eliciam comportamento apetitivo e de aproximação (Dean et al. 1988; Dean & Redgrave, 1991). Evidências do nosso laboratório mostram que as porções mediais do CS integram informações associativas, contextuais e motivacionais relacionadas ao predador e provenientes de sistemas neurais envolvidos na resposta de medo, enquanto as porções laterais recebem informações de sistemas sensoriais, em especial somatossensoriais da

região das vibrissas e focinho e parecem fazer parte de um sistema responsivo a estímulos da região da face e orofacial no sentido de afastamento de estímulos nocivos e aproximação a estímulos apetitivos tais como as presas.

É sabido que as vias de saída das porções laterais e mediais do CS fazem contactos, preferencialmente com núcleos pré-motores do tronco encefálico (Yasui et al., 1994, 1995; Shammah-Lagnado et al., 1999; Holstege et al., 1977; Jüch e Rokx, 1988; Li et al., 1995; Mogoseanu et al., 1993; Dobbins e Feldman, 1995) responsáveis por direccionar o animal no sentido de estímulos salientes inesperados ou desviá-lo, respectivamente (Redgrave et al., 1986; 1987; 1993). Em estudo com *Phaseolus vulgaris*, Comoli e Canteras (2000) sugerem que o CSI faz parte de um sistema de detecção da presença de objetos em movimento no ambiente; e pode exercer controle direto sobre movimentos oculares, orofaciais e dos membros dianteiros através de projeções descendentes; e modular a resposta motora comportamental via influências de projeções ascendentes sobre o circuito dos gânglios da base e cerebelo (Comoli e Canteras, 2000).

Assim sendo nossos resultados em conjunto com dados de literatura evidenciam o importante papel do Colículo Superior na integração sensório-motora de comportamentos motivados tais como a predação de insetos, que representa um comportamento motivado fundamental que executa um papel crítico na manutenção de várias espécies.

## 6. CONCLUSÃO

Os relatos apresentados nesse trabalho são de extrema importância e permitiram um entendimento mais refinado do papel do colículo superior no processamento de informações sensoriais e elaboração de padrões motores, permitindo maior elucidação da sua participação no contexto do comportamento predatório.

Nossos experimentos sugerem fortemente que as vibrissas apesar de não serem fundamentais para desencadear o comportamento predatório, elas são importantes para maior eficácia ou direcionamento para a ocorrência de ataques precisos durante o comportamento predatório, uma vez que elas podem ser vistas como órgãos sensoriais de localização de objetos e detecção a certas distâncias, fornecendo informações espaciais que podem levar à localização espacial de objetos a serem capturados (ver Bretch et. al., 1997).

Os dados de Fos no CSI sugerem fortemente que a razão pela qual animais lesados bilateralmente com NMDA na região do CSI apresentavam déficits que impossibilitavam o sucesso na predação está possivelmente mais relacionada à perda do controle motor decorrentes da morte de células da extremidade lateral das camadas intermediárias, especialmente a cinzenta. Já a perda de células na camada branca do CS estaria envolvida com os possíveis déficits atencionais. Diferentemente, em animais sem vibrissas, a redução da atividade da camada intermediária branca sugere que o rato fica menos provido de informações sensoriais espaciais que poderiam levar à localização espacial mais precisa das presas a serem capturadas.

Nossos resultados em conjunto com informações da literatura evidenciam o importante papel do Colículo Superior na integração sensório-motora de comportamentos motivados.



## REFERÊNCIAS

Anjum F, Turni H, Mulder PG, van der Burg J, Brecht M. Tactile guidance of prey capture in Etruscan shrews. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 103: 16544-9, 2006.

Bernard JF, Alden M, Besson JM. The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. **J Comp Neurol**. 329: 201-29, 1993.

Blanchard DC, Blanchard RJ, Lee MC, Williams G. Taming in the wild Norway rat following lesions in the basal ganglia. **Physiol Behav**. 27: 995-1000, 1981

Bolam JP. Preparation of central nervous system tissue for light and electron microscopy. In: **Experimental Neuroanatomy: a practical approach**. Ed: Bolam JP. Oxford University Press, pp. 1-29. 1992.

Born G, Schmidt M. Inhibition of Superior Colliculus neurons by a GABAergic input from the pretectal nuclear complex in the rat. **Eur J Neurosci**. 20: 3404-12, 2004.

Brecht M, Preilowski B, Merzenich MM. Functional architecture of the mystacial vibrissae. **Behav Brain Res**. 84: 81-97, 1997.

Burnett LR, Stein BE, Chaponis D, Wallace MT. Superior Colliculus lesions preferentially disrupt multisensory orientation. **Neuroscience**. 124: 535-47, 2004.

Butler AB, Hodos W. **Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation**. 2 ed. Nova Jérsei: Wiley Interscience, 2005.

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin study in the rat. **J Comp Neurol**. 348: 41-79, 1994.

Canteras NS, Swanson LW. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 89: 10089-93, 1992.

Casagrande VA, Harting JK, Hall WC, Diamond IT. Superior Colliculus of the tree shrew: a structural and functional subdivision into superficial and deep layers. **Science.** 177: 444-7, 1972.

Cedraz-Mercez PL, Comoli E. Superior Colliculus: an important site involved in behavioral responses selection. **46th Ann Meeting Animal Behavior Society**, Pirenópolis, Brazil, 2009.

Cohen DR, Curran T. The structure and function of the Fos proto-oncogene. **Rev Oncogen.** 1: 65-88, 1989.

Cohen JD, Hirata A, Castro-Alamancos MA. Vibrissa sensation in Superior Colliculus: wide-field sensitivity and state-dependent cortical feedback. **J Neurosci.** 28:11205-20, 2008.

Coizet V, Comoli E, Westby GW, Redgrave P. Phasic activation of substantia nigra and the ventral tegmental area by chemical stimulation of the Superior Colliculus: an electrophysiological investigation in the rat. **Eur J Neurosci.** 17: 28-40, 2003.

Comoli E, Canteras NS. Characterization of the neural systems mobilized during predatory behavior in rats. **28º Encontro Anual da Society for Neuroscience.** Painel nº 678, 1998.

Comoli E, Canteras NS. Lateralmost region of intermediate layer of Superior Colliculus: a key site involved in the motor control of predatory hunting. **31º Encontro Anual da Society for Neuroscience.** Painel nº847.5, 2000.

Comoli E, Cedraz-Mercez PL. Involvement of Superior Colliculus in selecting behavioral responses in rats while in a conflicting and stressful context. **12<sup>th</sup> International Conference on Neuroscience and Biological Psychiatry “Stress and Behavior” and 2<sup>nd</sup> international Stress and Behavior Society Congress.** St. Petersburg, Russia, 2009.

Comoli E, Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behav Brain Res.** 138:17-28, 2003.

Comoli E, Ribeiro-Barbosa ER, Negrão N, Goto M e Canteras NS. Functional mapping of the prosencephalic systems involved in organizing predatory behavior in rats. **Neuroscience.** 130:1055–67, 2005.

Curran T, Franza BR. Fos and Jun: The AP-1 connection. **Cell.** 55: 395-7, 1988.

Curran T, Morgan JI. Fos: An immediate-early transcription factor in neurons. **J Neurobiol.** 26: 403-412, 1995.

Curran T. Fos and Jun: Ontogenic transcription factors. **Tohoku J Exp Med,** 168: 169-74, 1992.

Dean P, Mitchell IJ, Redgrave P. Responses resembling defensive behaviour produced by microinjection of glutamate into Superior Colliculus of rats. **Neuroscience.** 24: 501-10, 1988.

Dean P, Redgrave P. Approach and avoidance systems in the rat. In: **Visual structures and integrated functions:** Research notes in neural computing. Eds: Arbib MA, Ewert JP, pp. 191-204. Springer-Verlag, 1991.

Dean P, Redgrave P. The Superior Colliculus and visual neglect in the rat and hamster. I. Behavioural Evidence. **Brain Res Rev,** 8:129-41, 1984.

Dean P, Redgrave R, Westby GWM. Event or emergency? Two response systems in the mammalian Superior Colliculus. **Trends Neurosci.** 12:137-47, 1989.

Diamond ME, von Heimendahl M, Knutsen PM, Kleinfeld D, Ahissar E. 'Where' and 'what' in the whisker sensorimotor system. **Nat Rev Neurosci.** 9: 601-12, 2008.

Diamond ME, Zorzin E, Arabzadeh E. Neuronal encoding of natural stimuli: the rat tactile system. **Novartis Found Symp.** 270: 18-31, discussion 31-7, 51-8, 2006.

Dobbins EG, Feldman JL. Differential innervation of protruder and retractor muscles of the tongue in rat. **J Comp Neurol.** 357: 376-94, 1995.

dos Santos LM, Ferro MM, Mota-Ortiz SR, Baldo MV, da Cunha C, Canteras NS. Effects of ventrolateral striatal inactivation on predatory hunting. **Physiol Behav.** 90: 669-73, 2007.

Doubell TP, Skaliora I, Baron J, King AJ. Functional connectivity between the Superficial and Deeper Layers of the Superior Colliculus: an anatomical substrate for sensorimotor integration. **J Neurosci.** 23: 6596-607, 2003.

Dragunow M, Faull HA. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. **J Neurosci Methods,** 29: 261-5, 1989.

Dragunow M, Robertson HA. Localization and induction of c-fos protein-like immunoreactive material in the nuclei of adult mammalian neurons. **Brain Res.** 440: 252-60, 1988.

Eisenberg JF, Leyhausen P. The phylogenesis of predatory behavior in mammals. **Z Tierpsychol.** 30:59-93, 1972.

Favaro PN, Comoli E. Different pattern of afferent connections may influence Superior Colliculus in selecting behavioral responses in rats. **46th Ann Meeting Animal Behavior Society,** Pirenópolis, Brazil, 2009.

Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. **J Histochem Citochem.** 33: 845-53, 1985.

Fritsch B. Retinal projections in European Salamandridae. **Cell Tissue Res.** 213: 325-41, 1980.

Gather NS, Stein BE. Reptiles and mammals use similar sensory organizations in the midbrain. **Science**. 205: 595-597, 1979.

Gibson JJ. Observations on active touch. **Psychol Rev**. 69: 477-90, 1962.

Grant RA, Mitchinson B, Fox CW, Prescott TJ. Active touch sensing in the rat: anticipatory and regulatory control of whisker movements during surface exploration. **J Neurophysiol**. 101: 862-874, 2009.

Grantyn A, Berthoz A. Burst activity of identified tecto-reticulo-spinal neurons in the alert cat. **Exp Brain Res**. 57: 417-21, 1985.

Hajnal A, Pothos EN, Lénárd L, Hoebel BG. Effects of feeding and insulin on extracellular acetylcholine in the amygdala of freely moving rats. **Brain Res**. 785: 41-8, 1998.

Hemelt ME, Keller A. Superior Colliculus control of vibrissa movements. **J Neurophysiol**. 100: 1245-54, 2008.

Hemelt ME, Keller A. Superior sensation: Superior Colliculus participation in rat vibrissa system. **BMC Neurosci**. 31: 8-12, 2007.

Hoffer ZS, Arantes HB, Roth RL, Alloway KD. Functional circuits mediating sensorimotor integration: quantitative comparisons of projections from rodent Barrel Cortex to Primary Motor Cortex, Neostriatum, Superior Colliculus and the Pons. **J Comp Neurol**. 488: 82-100, 2005.

Holstege G, Kuypers HGJM, Dekker JJ. The organization of the bulbar fibre connections to the trigeminal, facial and hypoglossal motor nuclei. II An autoradiographic tracing study in cat. **Brain**, 100: 265-86, 1977.

Huber C, Crosby EC. A phylogenetic consideration of the optic tectum. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 19:15-22, 1933.

Huerta MF, Frankfurter A, Harting JK. Studies of the principal sensory and spinal trigeminal nuclei of the rat: projections to the Superior Colliculus, inferior olive and cerebellum. **J Comp Neurol.** 220:147-67, 1983.

Isa T, Sasaki S. Brainstem control of head movements during orienting: organization of the premotor circuits. **Prog Neurobiol.** 66: 205-41, 2002.

Itoh K, Konishi A, Nomura S, Mizuno N, Nakamura Y, Sugimoto T. Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. **Brain Res.**175: 341-6, 1979.

Jadhav SP, Wolfe J, Feldman DE. Sparse temporal coding of elementary tactile features during active whisker sensation. **Nat Neurosci.** *no prelo.* 2009.

Jüch PJW, Rokx JTM. Efferent projections of the parvocellular reticular nucleus to the mesencephalic trigeminal nucleus in rat. **Brain Res.** 462: 185-9, 1988.

Kanaseki T, Sprague JM. Anatomical organization of pretectal and tectal laminae in the cat. **J Comp Neurol.** 158: 319-37, 1974.

Keay KA, Dean P, Redgrave P. N-methyl D-aspartate (NMDA) evoked changes in blood pressure and heart rate from the rat Superior Colliculus. **Exp Brain Res.** 80: 148-56, 1990a.

Keay KA, Westby GWM, Frankland P, Dean P, Redgrave P. Organization of the crosses tect-reticulo-spinal projection in rat - II Electrophysiological evidence for separate output channels to the periabducens area and caudal medulla. **Neuroscience.** 37: 585-601, 1990b.

Kiernan JA. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what are they and what they do. *Microscopy Today.* 00-01: 8-12, 2000.

Killackey HP, Erzurumlu RS. Trigeminal projections to the Superior Colliculus of the rat. **J Comp Neurol.** 201:221-42, 1981.

Kilpatrick IC, Collingridge GL, Starr MS. Evidence for the participation of nigrotectal gamma-aminobutyrate-containing neurones in striatal and nigral-derived circling in the rat. **Neuroscience**. 7: 207-22, 1982.

King SM, Shehab S, Dean P, Redgrave P. Differential expression of fos-like immunoreactivity in the descending projections of Superior Colliculus after electrical stimulation in the rat. **Behav Brain Res**. 78: 131-45, 1996.

Kolmac CI, Power BD, Mitrofanis J. Patterns of connections between Zona Incerta and brainstem in rats. **J Comp Neurol**. 396:544-55, 1998.

Krout KE, Loewy AD, Westby GWM, Redgrave P. Superior Colliculus projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. **J Comp Neurol**. 431: 198-216, 2001.

Krukoff TL, Harris KH, Jhamandas JH. Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. **Brain Res Bull**, 30: 163-172, 1993.

Leyhausen P. On the function of relative hierarchy of moods (shown by the example of the phylogenetic and ontogenetic development of predatory behavior in beasts of prey). **Z Tierpsychol**. 22: 412-94, 1965.

Li Y, Takada M, Kaneko T, Mizuno N. Premotor neurons for trigeminal motor nucleus neurons innervating the jaw-closing and jaw-opening muscles: differential distribution in the lower brainstem of the rat. **J Comp Neurol**. 356: 563-79, 1995.

Major DE, Luksch H, Karten HJ. Bottlebrush dendritic endings and large dendritic fields: motion-detecting neurons in the mammalian tectum. **J Comp Neurol**. 423: 243-60, 2000.

May PJ. The mammalian Superior Colliculus: laminar structure and connections. **Prog Brain Res**. 151:321-78, 2006.

Merali Z, McIntosh J, Kent P, Michaud D, Anisman H. Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala. **J Neurosci.** 18: 4758-66, 1998.

Mogoseanu D, Smith AD, Bolam JP. Monosynaptic innervation of trigeminal motor neurones involved in mastication by neurones of the parvicellular reticular formation. **J Comp Neurol.** 336: 53-63, 1993.

Morgan JI, Curran T. Calcium and proto-oncogene involvement in the immediate-early response in the nervous system. **Ann N Y Acad Sci.** 568: 283-90, 1988.

Morgan JI, Curran T. In: **Psychopharmacology: the fourth generation of progress.** Eds: Bloom FE, Kupfer DJ. Nova Iorque: Raven Press, 631-42, 1995.

Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: role of cellular immediate-early genes. **Trends Neurosci.** 12: 259-462, 1989.

Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. **Ann Rev Neurosci.** 14:421-51, 1991.

Moyer KE. Kinds of aggression and their physiological basis. **Commun Behav Biol, Part A.** 2: 65-87, 1968.

Myer JS, White RT. Aggressive motivation in the rat. **Anim Behav.** 13:430-3, 1965.

Negrão N, Schmidek. Individual differences in the behavior of rats (*Rattus norvegicus*). **J Comp Neurol.** 101: 107-11, 1987.

Newman GR, Jasani B, Williams ED. Metal compound intensification of the electron-density of diaminobenzidine. **J Histochem Citochem.** 12: 1430-4, 1983.



Nicolelis MAL, Chapin JK, Lin RCS. Somatotopic maps within the Zona Incerta relay parallel GABAergic somatosensory pathways to the neocortex, Superior Colliculus, and brainstem. **Brain Res.** 577: 134-41, 1992.

Nishida SM. **Estudo ontogenético da individualização comportamental no rato (*Rattus norvegicus*)**. Ribeirão Preto (Dissertação de Mestrado - Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 1987.

Northcutt RG. Anatomical organization of the optic tectum in reptiles. In: **Comparative Neurology of the Optic Tectum**. Ed: Vanegas H . p. 547-600. Nova Iorque: Plenum, 1984.

O'Boyle M. The rat as a predator. **Psychol Bull.** 82: 460-2, 1975.

Paxinos G, Watson C. **The Rat Brain** in stereotaxic coordinates. 6a. ed. Academic Press, 2007.

Petrovich GD, Risold PY, Swanson LW. Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. **J Comp Neurol.** 374: 387-420, 1996.

Polsky RH. Hunger, prey feeding, and predatory aggression. **Behav Biol.** 13: 81-93, 1975.

Pomonis JD, Jewett DC, Kotz CM, Briggs JE, Billington CJ, Levine AS. Sucrose consumption increases naloxone-induced c-Fos immunoreactivity in limbic forebrain. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 278: R712-9, 2000.

Rebouças RC, Schmidek WR. Handling and isolation in three strains of rats affect open field, exploration, hoarding and predation. **Physiol Behav.** 62: 1159-64, 1997.

Redgrave P, Dean P, Westby GWM. Organization of the crossed tecto-reticulo-spinal projection in rat - I. Anatomical evidence for separate output channels to the periabducens area and caudal medulla. **Neuroscience.** 37: 571-84, 1990.

Redgrave P, Marrow L, Dean P. Topographical organization of the nigrotectal projection in rat: evidence for segregated channels. **Neuroscience**. 50: 571-95, 1992.

Redgrave P, Mitchell IJ, Dean P. Descending projections from the Superior Colliculus in rat: a study using orthograde transport of wheatgerm-agglutinin conjugated horseradish peroxidase. **Exp Brain Res**. 68: 147-67, 1987.

Redgrave P, Odekunle A, Dean P. Tectal cells of origin of predorsal bundle in rat: location and segregation from ipsilateral descending pathway. **Exp Brain Res**. 63: 279-93, 1986.

Redgrave P, Westby GWM, Dean P. Functional architecture of rodent Superior Colliculus: relevance of multiple output channels. In: **Progress in Brain Research** (Vol. 95) Ed: Hicks, TP, pp. 69-77, Elsevier, 1993.

Reiner A. Laminar distribution of the cells of origin of ascending and descending tectofugal pathways in turtles: implications for the evolution of tectal lamination. **Brain Behav Evol**. 43: 254-92, 1994

Sahibzada N, Dean P, Redgrave P. Movements resembling orientation or avoidance elicited by electrical stimulation of the Superior Colliculus in rats. **J Neurosci**. 6: 723-33, 1986.

Saper CB, Loewy AD. Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. **Brain Res**. 22: 291-317, 1980.

Schenberg LC, Póvoa RM, Costa AL, Caldellas AV, Tufik S, Bittencourt AS. Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. **Neurosci Biobehav Rev**. 29: 1279-98, 2005.

Sefton AJ, Dreher B, Harvey A. Visual System. In: Paxinos G. **The Rat Nervous System**. 3 ed. Londres: Elsevier, 2004. cap. 32, p. 1083-165.

Sefton AJ, Dreher B. Visual system. In: **The Rat Nervous System**. Ed: Paxinos G. pp. 833-98. Academic Press Inc, 1995.

Shammah-Lagnado SJ, Alheid GF, Heimer L. Afferent connections of the interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure and adjacent amygdalostriatal transition area in the rat. **Neuroscience**. 94: 1097-123, 1999.

Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of *c-fos* and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron**. 4:477-85, 1990.

Shu S, Ju G, Fan J. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. **Neurosci Lett**. 85: 169-71, 1988.

Siegel S, Castella Jr NJ. **Estatística não paramétrica para ciências do comportamento**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

Sparks DL. Translation of sensory signals into commands for control of saccadic eye movements: role of the primate Superior Colliculus. **Physiol Rev**. 66: 118-71, 1986.

Stein BE, Meredith MA. **The merging of the senses**. The MIT Press, 1993.

Stein BE. Organization of the rodent Superior Colliculus: some comparisons with other mammals. **Behav Brain Res**. 3: 175-88, 1981.

Swanson LW. **Brain maps: structure of the rat brain**. 3 ed. Londres: Elsevier, 2004.

Vergnes M. Initiation of mouse-killing behavior following amygdaloid lesions in the rat. **Physiol Behav**. 14: 271-6, 1975.

Vincent SB. The function of vibrissae in the behavior of the white rat. **Behavior Monogr**. 1:81, 1912.

Waleszczyk WJ, Wang C, Benedek G, Burke W, Dreher B. Motion sensitivity in cat's Superior Colliculus: contribution of different visual processing channels to response properties of collicular neurons. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**. 64: 209-28, 2004.

Wilczynski W, Northcutt RG. Connections of the bullfrog striatum: efferent projections. **J Comp Neurol**. 214: 333-43, 1983.

Wisden JW, Errington ML, Williams S, Dunnett SB, Waters C, Hitchcock D, Evens G, Bliss TV, Hunt SP. Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. **Neuron**. 4: 603-614, 1990.

Wolfe J, Hill DN, Pahlavan S, Drew PJ, Kleinfeld D, Feldman DE. Texture coding in the rat whisker system: slip-stick versus differential resonance. **PLoS Biol**. 6: e215, 2008.

Wurtz RH, Albano JE. Visual-motor function of the primate Superior Colliculus. **Ann Rev Neurosci**. 3, 189-226, 1980.

Yasui Y, Breder CD, Saper CB, Cechetto DF. Autonomic responses and efferent pathways from the insular cortex in the rat. **J Comp Neurol**. 303: 355-74, 1991.

Yasui Y, Tsumori T, Ando A, Domoto T, Kayahara, Nakano K. Descending projections from the Superior Colliculus to the reticular formation around the motor trigeminal nucleus and the parvicellular reticular formation of the medulla oblongata in the rat. **Brain Res**. 656: 420-6, 1994.

Yasui Y, Tsumori T, Ando A, Domoto T. Demonstration of axon collateral projections from the substantia nigra pars reticulata to the Superior Colliculus and the parvicellular reticular formation in the rat. **Brain Res**. 674: 122-6, 1995.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)