

Programa de pós-graduação em Neurociências

Universidade Federal de Minas Gerais

Cristiano Soares Simões

**Modulação da Amígdala Basolateral sobre o Colículo Inferior no
condicionamento clássico ao medo**

Belo Horizonte

2020

Cristiano Soares Simões

**MODULAÇÃO DA AMÍGDALA BASOLATERAL SOBRE O COLÍCULO
INFERIOR NO CONDICIONAMENTO CLÁSSICO AO MEDO**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação
em Neurociências da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito para obtenção do
grau de Doutor

Linha de pesquisa: Neurociências molecular,
sistêmica, comportamental e computacional

Orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra
Moraes, PhD

Coorientador: Dr. Flávio Afonso Gonçalves
Mourão, PhD

Belo Horizonte

2020

043 Simões, Cristiano Soares.
Modulação da amígdala basolateral sobre o colículo inferior no condicionamento clássico ao medo [manuscrito] / Cristiano Soares Simões. - 2020.

73 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes. Coorientador: Dr. Flávio Afonso Gonçalves Mourão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Medo. 3. Complexo Nuclear Basolateral da Amígdala. 4. Colículo inferior - Teses. 5. Muscimol. I. Moraes, Márcio Flávio Dutra. II. Mourão, Flávio Afonso Gonçalves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Modulação da Amígdala Basolateral sobre o Colículo Inferior no condicionamento clássico ao medo

CRISTIANO SOARES SIMOES

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em NEUROCIÊNCIAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em NEUROCIÊNCIAS, área de concentração NEUROCIÊNCIAS BÁSICAS.

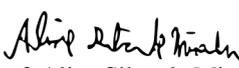
Aprovada em 30 de junho de 2020, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Márcio Flávio Dutra Moraes - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof. Victor Rodrigues Santos
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof. Rafael Naime Ruggiero
Universidade de São Paulo


Prof. Jean Faber Ferreira Abreu
Universidade Federal de São Paulo


Prof. Aline Silva de Miranda
Universidade Federal de Minas Gerais


Dr. Flávio Afonso Gonçalves Mourão – Co-orientador
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 30 de junho de 2020.

Este trabalho foi desenvolvido no Núcleo de Neurociências (NNC) do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Bloco A4 sala 168/240, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com auxílio das seguintes agências de fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

Aos meus filhos Antônio e Valentina.

AGRADECIMENTOS

Iniciei meu doutorado com quase 40 anos, dois filhos e uma vida financeira instável. Havia passado os quatro anos anteriores afastado da academia, desde que havia voltado de Natal, onde fiz meu mestrado e cheguei a iniciar o que seria uma primeira tentativa frustrada de fazer o doutorado. As chances de sucesso eram tão improváveis e as recomendações contrárias tão insistentes que entrei de cenho franzido e passos duros, vislumbrando adiante uma travessia árida, teimosa e solitária, quase quixotesca, por minha própria conta e risco. Supus que, ao final do percurso, não haveria muitos nomes a listar nesta página. Nunca estive tão redondamente enganado em minha vida. Este quixote não teria passado sequer do primeiro moinho sem a ajuda de uma gama diversa de pessoas muito generosas.

Em primeiro lugar, agradeço à minha família pelo apoio e formação de toda uma vida. À minha mãe, meus irmãos e sobrinhos, mas principalmente ao meu pai que, mesmo achando que “ciência é coisa de gente doida” e “coisa de poeta”, nunca me faltou.

Em segundo lugar, à família científica que me acolheu no NNC. Não digo isso de maneira casual e protocolar. Desde o primeiro e-mail que troquei com o Márcio em 2009, pedindo conselhos sobre o caminho a seguir na minha incipiente carreira acadêmica, o NNC tem significado para mim casa e acolhimento.

Não apenas científico mas até mesmo um teto para morar. Mestre, creio que sejamos ambos bons com as palavras. Mas às vezes nada é mais eloquente que um singelo muito obrigado. Muito obrigado pela casa, tanto a científica quanto a residencial. Muito obrigado pelas portas abertas do laboratório, do apê da Castelo Serpa, da sua casa e da sua família, da do Dr. Tasso e Dona Maria, e obrigado pelo cheiro de mineiridade boa que exala de cada uma delas. Muito obrigado pelo apoio, pelo suporte, pela paciência, pela compreensão das minhas limitações e pelo reconhecimento das minhas qualidades. Mas, sobretudo, muito obrigado pelo respeito e honestidade intelectuais. Creio que este será o maior legado que levarei do NNC. Muito obrigado, Mestre.

E muito obrigado também à pessoa sem a qual você não abriria essas portas. Talvez sequer encontrasse as chaves! Hahaha! Obrigado, Grace, pelo carinho, respeito, compreensão

e acolhimento ao longo desses anos. Você é um exemplo de batalhadora científica para todos nós.

Aos demais professores do NNC, André e Juliana, também pelo respeito, apoio e troca científica ao longo dos anos.

Bruno e Cleiton, que mal consigo chamar de professores, tamanho o senso de camaradagem e amizade, que vai além da troca científica. Obrigado pela assistência e ombro amigo de ambos durante os momentos de maior turbulência. “Bruno, hoje tem Anos 80 na Obra, bora?” E Cleiton, cuidado com café forte e ovo mexido salgado de manhã, faz mal para a pressão!

Aos professores da pós que também foram fundamentais nesta jornada, em momentos pontuais ou ao longo dela: Paula Scalzo, Fabrício Moreira, Antônio Oliveira e Hani Yehia. E meu especial agradecimento, carinho e amizade à Profa. Angela Ribeiro, que ministrou a primeira aula de Neuro que assisti na vida, na especialização, em 2004, e se tornou, desde então, uma grande amiga e incentivadora da minha carreira científica.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, cujo apoio, muitas vezes discreto, é sempre fundamental para que a engrenagem da pesquisa não pare de funcionar: ao cruzeirense Taquinho, Cássio, Samir, Dona Nely e, principalmente, à Nilda, à Carmen e ao camarada Carlos Magno pela constante presteza e eficiência na atuação junto à secretaria da pós.

Aos colegas do NNC, pelo convívio e tantas e tão boas experiências compartilhadas nas bancadas, nos corredores, na copinha, nos butecos e pela vida. Um agradecimento especial à minha irmãzinha Bia, adversária ferrenha nas pegadinhas, mas companheira indispensável igualmente nas risadas e nos lamentos.

Aos ex-alunos do Darkside que tocaram os primórdios do projeto “*steady-state*”, representados aqui na figura do grande amigo André Lockmann, que me passou o bastão, e com quem a amizade se mantém para além das fronteiras da ciência.

Aos companheiros de Darkside que passaram e seguiram seus caminhos, mas não sem deixar boas lembranças: Pedrão, o fotógrafo de notebook; Paulitcho, “menino bão”, o genro

que toda mãe pediu a deus; Hyo, companheira de ralação; e os recém-doutores na saúde Henrique (“Je ne me sois, Moravito!”) e Eric (“Simões tá na pista, Levíticos!”).

Aos ainda habitantes do Dark. Lari, companheira de butecos, aflições e de “Cracolândia”. Léo também, mas especialmente pela melhor notícia de todo o doutorado: o comportamento funcionou! Sr. Medeiros, que convergiu colaborações, mas sobretudo por compartilhar a ironia pela vida (“Tudo bem, Sr. Simões?”, “Você quer a resposta retórica ou a verdadeira, Sr. Medeiros?”). Matheus, pela brilhante colaboração na histologia. E Jonesito, esse ser de luz (“música é formação de caráter”), meu companheiro de Mineirão e guru das análises (“O que você acha deste sinal, John?”, “Hmmm...”).

Aos colegas da pós em Neuro, representados aqui pela minha querida amiga Joana Andrade. Que grande presente este improvável reencontro na neuro depois de tanto tempo, desde os idos da Ciclope, hein, Jojô! (mas ninguém precisa saber que esses tempos foram no século passado!)

Aos amigos da vida, que são tantos e tão valiosos. Os pelejandos, minha família sem DNA, sempre monitorando o estado das coisas e sempre me incentivando, pois eles me conhecem muito bem e sabem o que isto significa para mim. Agora vai, Mateusão!

Ao meu fiel amigo Marcelo, pelo apoio recíproco durante momentos de grande e coincidente instabilidade para ambos e por ter testemunhado alguns dos momentos mais assustadores desse período (“Cronometra pra mim, Celesa?”).

À suave força feminina de Giulia, Cris Arima, Cris Abreu, Kia e Bruna, que me ampararam, sustentaram e acenderam faróis ao longo do meu denso nevoeiro.

À minha psiquiatra Ana Emília, mais um exemplo dessa elegante força feminina capaz de derrubar e refundar a presunçosa resiliência masculina em apenas uma frase (e com o auxílio estabilizador de meia xícara de Sertralina e várias pitadas de Rivotril ao longo de dois anos).

Aos alunos da FEAD e do curso de especialização, cujo convívio sempre foram uma fonte revigorante de prazer pela produção e propagação do conhecimento.

Aos meus filhos Antônio e Valentina, por razões que escapam às palavras, mas que o coração entende, porque acelera, e os olhos confirmam, porque embaçam. Mas até onde o verbo consegue ir, meus filhos, obrigado por me reinventarem, desde o parto e até hoje, a cada dia, a cada mudança. Foram tantas que já não me lembro de quem eu era antes de vocês. E me entusiasma imaginar para onde ainda vamos. Amor é isso. Eu sei.

E, finalmente -- mas não menos importante --, àquele que nos dá a energia da vida, a força vital, a confiança para seguir em frente, firmes e vigilantes, apesar dos percalços do dia-a-dia: o café!

AGRADECIMENTO ESPECIAL AO FLÁVIO

“Joga logo esse anel em Mordor, Simões!”, soltou ele numa dessas madrugadas em que discutíamos os resultados da tese e do artigo. Um pequena epifania, despretensiosa e brincalhona, sarcástica e cheia de referências, bem ao nosso estilo, que definiu nossa amizade, afinidade e parceria ao longo desta saga que foi o doutorado.

Se você a acompanhou, certamente se perguntou com surpresa por que o Flávio estava ausente das páginas anteriores. Bom, aqui está a razão: ele precisa de uma página inteira. Se seu nome está lá, por favor, não fique com ciúmes. Vocês todos foram espetaculares e fundamentais. Principalmente você, Mestre! Você foi nosso Gandalf, o idealizador de tudo, mas que às vezes precisou correr por outros caminhos para trazer a cavalaria no momento certo. Mas sem seu respectivo Samwise Gamgee, nem aquele Sr. Frodo e nem este teriam passado sequer das fronteiras do



Condado. Assim como o outro, comecei a jornada animado e cheio de coragem, mas não esperava que a carga fosse pesar tanto e que eu fosse me sentir tão fragilizado ao longo do caminho. E, em muitos desses momentos, foi o bom e velho Flavitcho, com sua obstinação, dedicação e amizade, que me carregou, me puxou, me fez continuar e não me deixou entregar os pontos.

Eu tenho muita sorte em encontrar amigos por onde passo. Não falo de colegas, falo de amigos mesmo, desses em que a gente pode confiar 100% e que se tornam irmãos presenteados pela vida. A afinidade com muitos deles nasceu e foi cultivada através da música. Com o Flávio não foi diferente. Do Nick Cave ao Mogwai, do Cohen ao Godspeed, do Jeff Buckley ao Sigur Rós, da PJ Harvey à Cat Power, de Cartola a Gil Scott-Heron, do Constantina ao Hurtmold, passando pela concordância de que o Morrissey, apesar de espetacular, é um chato e que o Johnny Marr é um cara massa, nossas “músicas para se ouvir

no térreo” nos aproximaram e nos mantêm unidos, companheiros de dias malditos e benditos. E hoje, na parede da minha sala, ao lado do pôster do Nick Cave, está o do Possuídos. Sua relação com sua banda é uma espécie de metonímia da sua vida, Flavitcho. Da sua dedicação, da sua persistência, do seu amor pelo que faz e do amor com que faz, da coerência entre seus ideais e ações. Uma capacidade executiva associada a uma sensibilidade estética que são raros de se ver em uma mesma pessoa. Poucas cenas te definem tanto como a que eu vi durante o show na ocupação embaixo do viaduto Santa Teresa. Ou durante a interrupção causada pela briga. Você lá, sentado no canto, de pernas cruzadas, fumando tranquilo, enquanto o pau quebrava lá embaixo, em meio àquele cenário de caos urbano. Em poucos minutos aquele sujeito pacato e sossegado se transformaria novamente no vocalista anarquista e visceral. O “monstro”, que eu até então desconhecia, completava ali o “médico”, trazendo à luz o equilíbrio do lado escuro da vida, cuja beleza tensa e obtusa sabemos enxergar e admirar. Tudo fez sentido.

Obrigado, Flavitcho. Bora escovar dente?

*“O homem de bom senso jamais comete uma loucura
de pouca importância”
(Johann Wolfgang Von Goethe)*

RESUMO

Foi demonstrado que o condicionamento ao medo aumenta as respostas evocadas em regime permanente no colículo inferior por um tom de longa duração modulado em amplitude. Neste trabalho testamos a hipótese de que a amígdala basolateral modula esse efeito, uma vez que ela desempenha um papel crucial na avaliação da relevância biológica de estímulos ambientais. Nós inibimos essa estrutura através da microinjeção local de um agonista do receptor GABA_A (muscimol) antes da sessão de teste de evocação da memória associativa em um paradigma auditivo de condicionamento ao medo e registramos a atividade evocada no núcleo central do colículo inferior. De acordo com nossos resultados, o tratamento com o muscimol diminuiu a expressão do comportamento de congelamento durante a sessão de teste, mas aumentou o arrasto do envelope de modulação na atividade do colículo inferior. Repetimos o protocolo de injeção com outro grupo de ratos, mas utilizando o som como estímulo neutro, sem pareamento a estímulos aversivos, e observamos que o aumento da atividade evocada no colículo inferior como resultado da inibição da amígdala basolateral é independente da tarefa de condicionamento. Nossos achados sugerem que essa estrutura exerce um controle inibitório tônico sobre a codificação da informação sensorial nos estágios iniciais da via auditiva.

ABSTRACT

It has been shown that fear conditioning improves the steady-state evoked potentials driven by a long-lasting amplitude-modulated tone in the inferior colliculus. In this work, we tested the hypothesis that the amygdala modulates this effect since it plays a crucial role in assessing the biological relevance of environmental stimuli. We inhibited the basolateral nucleus of the amygdala of rats by injecting a GABA_A receptor agonist (muscimol) before the recall test session of an auditory fear conditioning paradigm and recorded the evoked activity in the central nucleus of the inferior colliculus. According to our results, the treatment with muscimol decreased the expression of freezing behavior during the recall test session but increased the entrainment of the modulation envelope in the activity of the inferior colliculus. We repeated the injection protocol with another group of rats but without pairing the tone to an aversive stimulus and observed that the enhancement of the stimulus-driven activity in the inferior colliculus is a result of the inhibition of the basolateral amygdala, regardless of the conditioning task. Our findings suggest that this structure exerts a tonic inhibitory control over the encoding of sensory information at the early stages of the sensory pathway.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Padrão de ativação de células A1 e A2 e integração sensório-motora na mariposa para execução do comportamento de fuga do predador.	3
FIGURA 2 - Anotações e diagramas manuscritos por Donald Hebb utilizados em sua tese de doutorado.	6
FIGURA 3 - Localização, núcleos e circuitaria intrínseca do Complexo Amigdalóide.	11
FIGURA 4 - Mecanismos de detecção de disparos coincidentes por células-alvo induzem plasticidade pós-sináptica	13
FIGURA 5 - Oscilação preditiva de neurônios da LA na banda de frequência teta.	15
FIGURA 6 - Aumento de conectividade entre a região CA1 do Hipocampo e a BLA na banda teta durante tarefa após condicionamento ao medo.	17
FIGURA 7 - Mecanismos de acoplamento entre oscilações de diferentes frequências	19
FIGURA 8 - Circuitos funcionais do condicionamento ao medo no Complexo Amigdalóide.	20
FIGURA 9 - Localização do Colículo Inferior no cérebro de ratos	24
FIGURA 10 - Potenciais evocados auditivos transitório e em regime permanente.	30
FIGURA 11 - Cirurgia de implante de eletrodos e <i>setup</i> de registros eletrofisiológicos	37
FIGURA 12 - Protocolo experimental de condicionamento clássico ao medo associado do tratamento com muscimol e salina.	39
FIGURA 13 - Protocolo experimental de apresentação do estímulo neutro (NS) associado do tratamento com muscimol e salina.	41

FIGURA 14 - Resultados histológicos.	45
FIGURA 15 - Resultados comportamentais.	46
FIGURA 16 - Registros eletrofisiológicos.	47
FIGURA 17 - Análises da atividade eletrofisiológicas no CI.	49
FIGURA 18 - Critérios de exclusão dos animais da análise de registros da BLA.	50
FIGURA 19 - Critérios de inclusão de um animal na análise qualitativa de registros da BLA.	51
FIGURA 20 - Espectrograma para avaliação qualitativa da atividade na banda teta (4-10Hz) na BLA de um animal.	52
FIGURA 21 - Aumento da atividade em teta na BLA e no CI	53
FIGURA 22 - Circuito amígdalo-colicular proposto por este trabalho.	56
FIGURA 23 - Mecanismo do hipotético circuito amígdalo-colicular durante apresentação do CS sob efeito da injeção de salina.	59
FIGURA 24 - Mecanismo do hipotético circuito amígdalo-colicular durante apresentação do CS sob efeito da injeção de muscimol	60
FIGURA 25 - Mecanismo do hipotético circuito amígdalo-colicular durante apresentação do NS	61

LISTA DE ABREVIATURAS

- AP** - Ântero-Posterior
- BA** - Amígdala Basal (do inglês *Basal Amygdala*)
- BLA** - Amígdala Basolateral (do inglês *Basolateral Amygdala*)
- BLP** - Amígdala Basolateral Posterior
- BLV** - Amígdala Basolateral Ventral
- CACM** - Condicionamento Auditivo Clássico ao Medo
- CB⁺** - Interneurônios GABAérgicos positivos para calbindina
- CCK⁺** - Interneurônios GABAérgicos positivos para colecistoquinina
- CeA** - Amígdala Central (do inglês *Central Amygdala*)
- CeL** - Amígdala Central Lateral
- CeM** - Amígdala Central Medial
- ChR2** - Canal de Rodopsina do tipo 2 (do inglês *Channelrhodopsin*)
- CI** - Colículo Inferior
- CIC** - Núcleo Central do Colículo Inferior
- CS** - Estímulo Condicionado (do inglês *Conditioned Stimulus*)
- CS⁺** - Estímulo Condicionado
- CS⁻** - Estímulo Não-Condicionado
- DCIC** - Córtex Dorsal do Colículo Inferior
- DV** - Dorso-Ventral
- ECIC** - Córtex Externo do Colículo Inferior
- GABA** - Ácido Gama-Aminobutírico
- GABA_A** - Receptor GABAérgico do tipo A
- GABA_AR** - Receptor GABAérgico do tipo A
- GluR** - Receptor Glutamatérgico
- IL** - Área Infralímbica do Córtex Pré-Frontal
- LA** - Amígdala Lateral (do inglês *Lateral Amygdala*)
- LaVL** - Amígdala Lateral Ventro-Lateral

LaVM - Amígdala Lateral Ventro-Medial
LFP - Potencial de Campo Local (do inglês *Local Field Potential*)
ML - Médio-Lateral
mPFC - Córtex Prefrontal Medial (do inglês *Medial Prefrontal Cortex*)
MUS - Muscimol
NGM - Núcleo Geniculado Medial
NMDA - N-Metil D-Aspartato
NS - Estímulo Neutro (do inglês *Neutral Stimulus*)
PFC - Córtex Pré-Frontal (do inglês *Prefrontal Cortex*)
PL - Área Pré-Límbica do Córtex Pré-Frontal
PLV - Fator de Acoplamento de Fase (do inglês *Phase Locking Value*)
PV⁺ - Interneurônios GABAérgicos positivos para parvalbumina
REARP - Respostas Evocadas Auditivas em Regime Permanente
SAL - Salina
US - Estímulo Não-Condicionado (do inglês *Unconditioned Stimulus*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Mariposas sentem medo?	2
1.2 Aprendizado associativo	5
1.2.1 Condicionamento Clássico	5
1.3 Complexo Amigdalóide	7
1.4 Mecanismos de memória associativa na Amígdala Basolateral	10
1.5 Modulação Top-down	18
1.6 Colículo Inferior	20
1.7 Respostas Evocadas em Regime Permanente	22
1.8 Estudo das Respostas Evocadas em Regime Permanente no Colículo Inferior no Condicionamento Auditivo Clássico ao Medo	24
2. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Diretrizes éticas	29
4.2 Animais experimentais	29
4.3 Cirurgia de implante de eletrodos e cânulas	29
4.4 Histologia	30
4.5 Condicionamento Auditivo Clássico ao Medo (CACM)	31
4.6 Registros eletrofisiológicos e análise de dados	34
4.7 Análises estatísticas	35
5. RESULTADOS	36
5.1 Histologia e posicionamento dos eletrodos	36
5.2 Eletrofisiologia	37
5.3 O tratamento da BLA com muscimol prejudicou a expressão do comportamento condicionado	38
5.4 A energia e a sincronização de fase das REARPs no CI aumentaram durante a apresentação do CS no tratamento com salina e também com muscimol	39
5.5 Ajuste da hipótese: energia e sincronização de fase das REARPs no CI aumentam no tratamento com muscimol independente do condicionamento	40
5.6 Análise da BLA	40
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	45
8. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mariposas sentem medo?

“O que é o medo? Um produzido dentro da gente, um depositado; e que às vezes se mexe, sacoleja, e a gente pensa que é por causas: por isto ou por aquilo, coisas que só estão é fornecendo espelhos.”

(Riobaldo Tatarana)

Mariposas e morcegos formam um clássico exemplo de corrida armamentista evolutiva nas relações presa-predador. O desenvolvimento de hábitos noturnos e coloração opaca conferiram uma vantagem adaptativa a esses insetos em relação a predadores diurnos de visão acurada, como os pássaros. Morcegos insetívoros, no entanto, são capazes de identificar suas presas com grande precisão em ambientes escuros, mesmo em pleno vôo, uma vez que o fazem por ecolocalização.

Por outro lado, ao longo da história evolutiva algumas espécies de mariposas desenvolveram, em contraponto, estratégias de defesa baseadas em órgãos auditivos especializados, sensíveis a vibrações na faixa de frequência das vocalizações ultrassônicas que os morcegos utilizam no processo de ecolocalização. Essas estruturas são compostas de membranas timpânicas localizadas de cada lado do tórax desses insetos, sob suas asas, conectadas a duas classes de neurônios sensoriais, A1 e A2. Os neurônios A1 são mais sensíveis, respondendo a estímulos de mais baixa intensidade (FIGURA 1A). Quanto mais intenso o som, maior a frequência e menor a latência de disparos dessas células, o que permite à mariposa codificar a posição relativa do morcego no ambiente mesmo a longa distância. Ambos fazem sinapses com interneurônios nos gânglios torácicos que, por sua vez, ativam neurônios motores que controlam o movimento das asas (FIGURA 1B). O som eventualmente chegará a cada membrana com uma leve defasagem de tempo e intensidade, acarretando uma pequena diferença na taxa de disparo dos neurônios A1 (FIGURA 1C). Essa variação será refletida em um desbalanço na velocidade de batimento das asas, fazendo com que a mariposa mude de direção, se afastando da fonte sonora. Caso essa manobra não seja suficiente para dissuadir o ataque e o morcego permaneça em sua investida, sua aproximação fará com que as

vocalizações se tornem mais intensas, alcançando o limiar de ativação dos neurônios A2. A alta taxa de ativação desses sensores acelera o batimento das asas provocando movimentos aleatórios que dificultam a aproximação dos morcegos. Em último caso, sob a iminência do bote definitivo de seu predador, a resposta neuronal se torna tão alta que alcança um patamar de saturação que interrompe por completo o movimento das asas, fazendo com que a mariposa mergulhe em queda livre até o solo. A relva gera um fundo ruidoso para o sonar dos morcegos, funcionando como uma camuflagem acústica para as mariposas que, desta forma, são bem sucedidas em sua estratégia de defesa (ALCOCK, 2016).

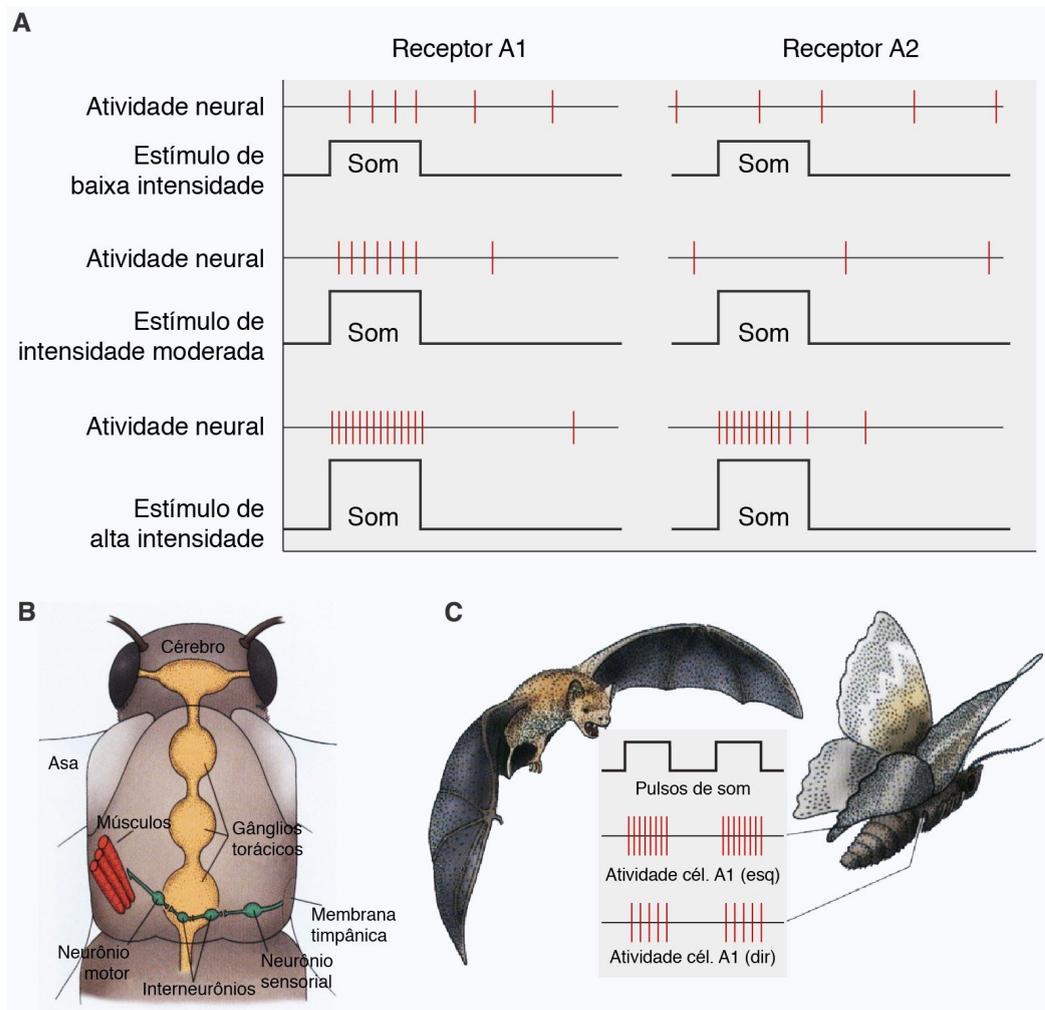


Figura 1 - Padrão de ativação de células A1 e A2 e integração sensório-motora na mariposa para execução do comportamento de fuga do predador. (A) Frequência de disparo das células sensoriais em função da intensidade do som. (B) Diferença de ativação das células A1 conforme intensidade em cada lado do corpo da mariposa. (C) Esquema anatômico do sistema nervoso da mariposa e conexão com a musculatura da asa. Adaptado de (ALCOCK, 2016).

As mariposas conseguem, dessa forma, detectar a presença de seu predador e colocar em prática um comportamento efetivo de evasão. Mas seria possível dizer que elas conseguem fugir porque têm medo dos morcegos?

Essa é uma pergunta bastante traiçoeira. A própria definição de medo vem sendo objeto de um vigoroso debate recesado recentemente dentro das neurociências e áreas correlatas (MOBBS et al., 2019). Para Joseph LeDoux, um dos maiores expoentes desta área de pesquisa, essa pergunta sequer faria sentido, pois o medo e outras emoções implicariam um componente subjetivo e consciente, divergente dos mecanismos comportamentais e fisiológicos, que não poderia ser estudado em animais (LEDOUX; DAW, 2018; LEDOUX, 2014; LEDOUX; PINE, 2016; LEDOUX; PHELPS; ALBERINI, 2016; MOBBS et al., 2019). De outro lado, reeditando uma espécie de releitura contemporânea da disputa entre as teorias da emoção de James-Lange e Cannon-Bard, pesquisadores não menos proeminentes na área, como Michael Fanselow, acenam com evidências de que esses aspectos seriam convergentes e, portanto, passíveis de abordagem na pesquisa com animais (FANSELOW; PENNINGTON, 2017; MOBBS et al., 2019). De toda forma, parece haver consenso de que o conceito de medo passa por um estado interno do organismo, provocado pela percepção de uma ameaça iminente, e que favorece a execução de um comportamento de defesa para além de um simples reflexo sensorio-motor.

Com base na ideia acima e no mecanismo descrito anteriormente, poderíamos dizer que as mariposas não apenas não temem os morcegos como sequer identificam sua existência como uma ameaça em si. Embora sua estratégia de fuga seja bastante engenhosa e eficiente, ela se baseia em um padrão comportamental estereotipado e em um mecanismo sensorio-motor inato, altamente especializado e selecionado para responder apenas a uma categoria muito específica de estímulos. A vantagem adaptativa desse tipo de mecanismo está na eficiência e especificidade da resposta. Por outro lado, a gama de estímulos nocivos que se pode evitar fica limitada àqueles que apresentam as características físicas capazes de provocar o reflexo de defesa, o que pode representar um grande risco em nichos com variações ambientais dinâmicas.

1.2 Aprendizado associativo

“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.”

(Riobaldo Tatarana)

Estratégias alternativas de identificação e evitação de ameaças surgiram ao longo da evolução de forma a contornar essa limitação. Aos mecanismos inatos de reflexos sensorio-motores se somaram, em grupos de vertebrados como répteis, aves e mamíferos, estruturas capazes de associar as características físicas de um estímulo ao efeito que produzem sobre o organismo (JANAK; TYE, 2015; MCDONALD, 1998). Um efeito nocivo, por exemplo, induz a associação entre o evento que o precedeu e padrões de respostas comportamentais capazes de afastar o indivíduo da fonte de perigo, através da integração de redes neuronais dinâmicas passíveis de alterações plásticas e dependentes, portanto, da experiência prévia do indivíduo. Uma vez estabelecidas, essas redes serão novamente acionadas pela identificação de estímulos com padrões semelhantes de ativação sensorial, que passam a funcionar como pistas regulares preditivas da iminência de uma ocorrência potencialmente prejudicial (DUVARCI; PARE, 2014). Esse tipo de habilidade cognitiva, denominada aprendizado associativo, possibilitou a ampliação do repertório de estímulos reconhecidos como relevantes à sobrevivência do indivíduo e se tornou crucial para o desenvolvimento de estratégias adaptativas de sobrevivência.

1.2.1 Condicionamento Clássico

O mecanismo geral descrito acima se aproxima bastante da definição de uma das formas mais básicas de aprendizado associativo, o condicionamento clássico, que veio a se tornar um dos paradigmas experimentais mais utilizados no estudo dos mecanismos mnemônicos associados ao comportamento. Ele foi descrito inicialmente por Ivan Pavlov, no final do século XIX, como o processo pelo qual um estímulo inicialmente neutro ganha relevância emocional (estímulo condicionado, CS) ao ser temporalmente pareado a um evento incondicionalmente relevante (estímulo incondicionado, US). Após a consolidação da

memória associativa, a apresentação do CS sozinho é capaz de deflagrar a expressão das respostas incondicionadas. No caso do estudo das reações defensivas e suas emoções correlatas, o CS é pareado a um estímulo naturalmente aversivo, como o cheiro de um predador ou um choque por corrente elétrica nas patas, configurando o que se convencionou chamar de condicionamento clássico ao medo. O estado orgânico interno de preparação para a rápida execução de comportamentos de luta ou fuga, desencadeado através da mediação do sistema nervoso autônomo simpático, é associado por alguns autores ao próprio conceito de emoção, caso da teoria dos marcadores somáticos de António Damásio (DAMÁSIO, 19 de novembro de 2012).

A resposta adaptativa nesse tipo de paradigma, portanto, não está codificada em circuitos reflexos inatos, mas depende da experiência prévia do indivíduo. Desta forma, a integração entre a entrada sensorial e a resposta motora adequada pressupõe a existência de estruturas intermediárias capazes de atribuir valência (positiva ou negativa) aos estímulos, promover a associação entre o CS e o US através de alterações plásticas de longo prazo que tornem essa associação estável e duradoura e desencadear respostas viscerais autonômicas e comportamentais de defesa correlatas ao medo.

Curiosamente, esses mecanismos intermediários estavam previstos na tese de doutorado de Donald Hebb, um dos mais influentes neurocientistas da história (FIGURA 2). A ideia da sinapse hebbiana teve sua origem no esforço de seu autor em conceber mecanismos que pudessem explicar a então recente descoberta de Ivan Pavlov. Naquele momento inicial de sua carreira, Hebb hipotetizava que neurônios ativos atraem as projeções de outras células, criando o que ele chamou de “rotas neurais” (HEBB, 1949).

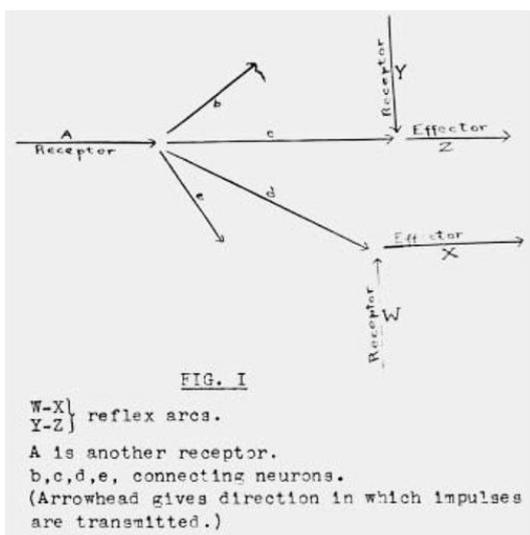


Figura 2 - Anotações e diagramas manuscritos por Donald Hebb utilizados em sua tese de doutorado. As ideias aqui ilustradas seriam a base de sua ideia de sinapse que influenciaria várias gerações de neurocientistas. Retirado de (HEBB, 1949).

Estruturas do lobo temporal medial têm sido associadas ao processamento de informações emocionalmente relevantes desde a década de 30 do século passado, com os trabalhos clássicos de James Papez e Paul McLean na descrição do chamado sistema límbico. Heinrich Klüver e Paul Bucy observaram o efeito deletério de lesões nessa região para o processamento emocional em macacos-rhesus (JANAK; TYE, 2015; SAH et al., 2003). Esse achado foi replicado mais tarde, na mesma espécie, com manipulações restritas à amígdala, evidenciando um prejuízo em comportamentos reforçados por condicionamento clássico, como, por exemplo, a capacidade de reconhecer pistas preditivas de um choque elétrico (WEISKRANTZ, 1956). A partir dessas descobertas, um rico campo de estudos foi inaugurado, sobretudo a partir da década de 1990, relacionando essa estrutura ao processamento de memórias aversivas.

1.3 Complexo Amigdalóide, o “metro quadrado mais caro” do cérebro

“Ou se fosse que algum perigo se produzia por ali, e eu colhia o aviso? Não é que, com muitos, dose disso sucedesse? Eu sabia, tinha ouvido falar: jagunços que pegam esse condão, adivinham o invento de qualquer sobrevir, por isso em boa hora escapam.”

(Riobaldo Tatarana)

O número de estudos sobre a relação entre a amígdala e o medo aprendido chegou a uma média aproximada de 400 artigos publicados por ano na primeira década deste século (DUVARCI; PARE, 2014) e continua crescendo. Uma busca pelo termo “*fear learning*” no portal Pubmed entre os anos 2011 e 2020 retorna quase 10.000 resultados, mais que dobrando a média em relação aos dez anos anteriores. O termo “*amygdala*” sozinho eleva em pelo menos duas vezes esses números, evidenciando o grande interesse sobre essa estrutura, uma das mais concorridas dentro das neurociências e áreas correlatas.

A amígdala é uma pequena estrutura em formato de amêndoa, localizada bilateralmente no pólo rostral do lobo temporal medial (FIGURA 3A). A julgar apenas por seu tamanho, não se poderia suspeitar que tantos processos cerebrais e funções biológicas dependem fundamentalmente da integridade de sua intrincada circuitaria interna (FIGURA 3C). Não se trata, portanto, de um único núcleo, mas de uma série de subnúcleos interligados por conexões unidirecionais ou recíprocas que compõem o que se convencionou chamar de Complexo Amigdalóide (SAH et al., 2003).

Seus dois principais subnúcleos são o basolateral (BLA), subdividido em lateral (LA), basal (BA) e basomedial (BM), e o central (CeA), subdividido em lateral (CeL) e medial (CeM) (DUVARCI; PARE, 2014; JANAK; TYE, 2015; SAH et al., 2003). A BLA é composta por neurônios principais glutamatérgicos, que perfazem cerca de 80% de suas células neuronais, e aproximadamente 20% de interneurônios GABAérgicos (DUVARCI; PARE, 2014). Essas células inibitórias, por outro lado, são predominante na CeA e em densos aglomerados espalhados lateralmente à BLA e entre os dois núcleos principais, sendo, por isso, chamadas de células intercalares (DUVARCI; PARE, 2014) (FIGURA 3C).

A BLA é a principal porta de entrada do fluxo informacional no complexo amigdalóide. A LA recebe aferências sensoriais ascendentes, vindas de núcleos do tálamo, e descendentes, originárias de córtices sensoriais associativos (QUIRK; REPA; LEDOUX, 1995) e primários (FREESE; AMARAL, 2005). A BA, além de receber projeções internas unidirecionais de neurônios glutamatérgicos da LA, estabelece conexões recíprocas (portanto também de saída) com áreas do hipocampo e da região medial do córtex prefrontal, que são essenciais na modulação do comportamento de medo (VIDAL-GONZALEZ et al., 2006). Interessante notar o aumento da BLA em relação à CeA ao longo do processo evolutivo em diferentes grupos de mamíferos, refletindo o aumento de áreas corticais que se comunicam com a BLA, especialmente em primatas comparativamente a outras espécies, como os roedores (CHAREYRON et al., 2011; JANAK; TYE, 2015) (FIGURA 3B).

Na outra ponta, a CeA -- mais especificamente a CeM -- é a principal porta de saída da informação processada na amígdala (DUVARCI; PARE, 2014). Essa estrutura recebe projeções glutamatérgicas diretas da BA e projeções inibitórias da CeL, que por sua vez recebe influência excitatória direta da LA ou inibitória indiretamente via células intercalares (DUVARCI; PARE, 2014; SAH et al., 2003). Os neurônios GABAérgicos de saída da CeM têm alvos variados distribuídos pelo encéfalo, mas são de fundamental relevância para o estudo do condicionamento clássico ao medo os núcleos do tronco encefálico, como a substância periaquedutal cinzenta, núcleos parabraquiais, núcleo do trato solitário e núcleo dorsal do vago (DUVARCI; PARE, 2014; HOPKINS; HOLSTEGE, 1978) (FIGURA 3C). São esses núcleos que deflagram as respostas viscerais autonômicas e controlam a expressão de comportamentos de defesa avaliados nesse tipo de paradigma, como o congelamento em ratos e outros roedores.

Os neurônios glutamatérgicos da LA projetam internamente para a BA, BM e diretamente para a CeL. Projeções semelhantes conectam a BA aos dois núcleos da CeA, influenciando diretamente as eferências de saída do complexo amigdalóide (DUVARCI; PARE, 2014) (FIGURA 3C). Os neurônios principais da BA representam, portanto, a via mais curta de integração sensório-motora entre os estímulos aversivos de entrada e as projeções eferentes de expressão do comportamento de defesa. O bloqueio farmacológico de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na BA -- mas não em núcleos da CeA --

prejudicam tanto a aquisição da memória associativa (FANSELOW; KIM, 1994; GOOSENS; MAREN, 2003) quanto sua expressão (LEE et al., 2001; MAREN et al., 1996), a depender se é realizado respectivamente antes da tarefa de condicionamento ou de sua evocação. A ativação de receptores inibitórios GABA_A na BLA, através da microinjeção local do agonista muscimol, também prejudica tanto a aquisição quanto a evocação da memória de medo, com maior decaimento do comportamento de congelamento na aplicação pré-teste, ou seja, na execução do comportamento aprendido (HELMSTETTER; BELLGOWAN, 1994).

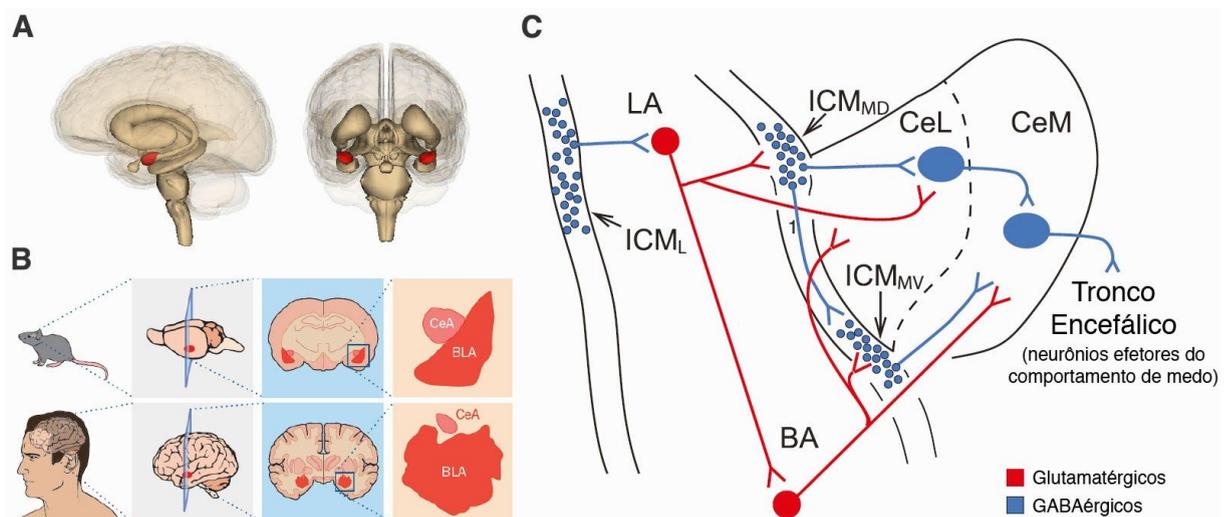


Figura 3 - Localização, núcleos e circuitaria intrínseca do Complexo Amigdalóide. (A) Localização no lobo temporal medial do cérebro humano, em vermelho (Licença Creative Commons). (B) Tamanho relativo dos seus núcleos principais (basolateral e central) em ratos e humanos. Adaptado de (JANAK; TYE, 2015). (C) Circuitaria intrínseca diferenciando neurônios excitatórios (em vermelho) e inibitórios (em azul) e suas respectivas projeções. Adaptado de (DUVARCI; PARE, 2014).

Apesar de historicamente associada ao processamento de estímulos de valência aversiva, estudos recentes vêm desvendando o envolvimento da amígdala também no aprendizado associado a estímulos positivos (TYE et al., 2008). Embora em ambos os tipos de tarefa haja o recrutamento e potenciação de neurônios glutamatergicos da LA via receptores NMDA, grupos neuronais que respondem a um tipo a um tipo de valência não respondem ao

outro e vice-versa, revelando especificidade na capacidade da LA em distinguir valência do estímulo (JANAK; TYE, 2015; TYE et al., 2008).

1.4 Mecanismos de memória associativa na Amígdala Basolateral

“Com assim, a gente se diferenciava dos outros -- porque jagunço não é muito de conversa continuada nem de amizades estreitas: a bem eles se misturam e desmisturam, de acaso, mas cada um é feito um por si.”

(Riobaldo Tatarana)

Estímulos acústicos pareados a choques nas patas são os mais comumente empregados nos desenhos experimentais de paradigmas de condicionamento clássico ao medo. Aferências diretas do núcleo geniculado medial (NGM), estrutura da via auditiva localizada no tálamo (LEDOUX; FARB; RUGGIERO, 1990), projetam sobre neurônios da LA que apresentam, assim, respostas evocadas por estímulos acústicos (BORDI; LEDOUX, 1992). Esses potenciais se caracterizam por um padrão de curta latência média, embora bastante variável, o que pode ser explicado pela sobreposição, no mesmo alvo das terminações talâmicas, de projeções corticais que chegam à LA com pequena, mas significativa defasagem temporal (LEDOUX; FARB; ROMANSKI, 1991; QUIRK; REPA; LEDOUX, 1995). Neurônios da LA respondem também a estímulos somatossensoriais através de projeções diretas do núcleo intralaminar posterior do tálamo e são temporalmente mais precisos que os auditivos, já que sua latência de resposta é menos variável, embora maior em média (ROMANSKI et al., 1993). Existem ainda aqueles que respondem às duas modalidades simultaneamente, revelando terminações polimodais convergentes sobre os neurônios principais da LA (ROMANSKI et al., 1993).

A convergência anatômica das projeções das duas modalidades se transforma em sincronia temporal a partir do pareamento entre o estímulo acústico e a robusta aferência somatossensorial que codifica o choque. Os disparos neuronais coincidentes promovem um mecanismo de facilitação sináptica hebbiana que reforça a conexão inicialmente fraca entre as fibras auditivas e os neurônios da LA, fazendo com que o CS passe a recrutá-los independentemente da apresentação concomitante do US. Como resultado, essas células passam a responder com maior taxa de disparo às rerepresentações do som inicialmente neutro (QUIRK; REPA; LEDOUX, 1995). Os neurônios com maior alteração no número de disparos foram os de menor latência, corroborando a ideia de que as projeções talâmicas do geniculado

são fundamentais para um rápido estabelecimento do circuito de resposta condicionada (QUIRK; REPA; LEDOUX, 1995). Além da frequência de ativação, houve também um aumento também na amplitude e inclinação dos potenciais evocados (ROGAN; STÄUBLI; LEDOUX, 1997). Essas alterações foram mantidas até 4 dias após a realização da tarefa de condicionamento, evidenciando um processo de potenciação de longo prazo (ROGAN; STÄUBLI; LEDOUX, 1997).

Detecção de coincidência

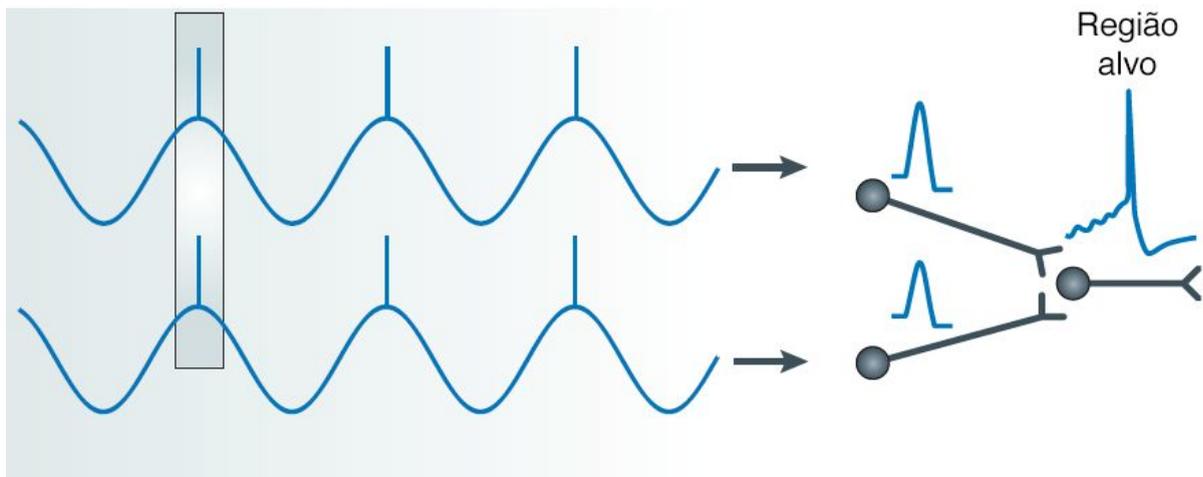


Figura 4 - Mecanismos de detecção de disparos coincidentes por células-alvo induzem plasticidade pós-sináptica. Adaptado de (FELL; AXMACHER, 2011).

Mecanismos como o descrito acima se baseiam essencialmente na detecção de disparos coincidentes na célula-alvo para gerar plasticidade (FELL; AXMACHER, 2011) (FIGURA 4), exigindo técnicas de alta resolução temporal para seu estudo detalhado. A expressão de rodopsinas sensíveis à luz em canais ionotrópicos permeáveis ao sódio permite um controle temporal preciso da ativação de células geneticamente modificadas através de estimulação óptica. Dois estudos tiraram proveito dessa técnica para ativar diretamente as terminações na LA, em substituição ora ao som ora ao choque, para testar a efetivação da associação entre CS e US. No primeiro, canais de rodopsina do tipo 2 (ChR2) foram expressos em neurônios principais da LA e ativados simultaneamente à apresentação de um som neutro, o que foi suficiente para substituir o choque e gerar o comportamento de congelamento durante a reapresentação do mesmo som (JOHANSEN et al., 2010). No

segundo, os ChR2 foram expressos nos terminais das projeções auditivas talâmicas e corticais e acionados simultaneamente ao choque nas patas. Nova reapresentação do estímulo óptico sozinho foi capaz de gerar a resposta condicionada, muito embora em uma tarefa de condicionamento operante (NABAVI et al., 2014).

O resultado bem sucedido desse tipo de mecanismo é que o som passa a exercer o papel de um preditor do estímulo nocivo, permitindo que o indivíduo se antecipe à sua ocorrência e execute o comportamento de defesa a contento. Uma vez estabelecido esse mecanismo, a ativação dos neurônios da LA a partir da apresentação do estímulo condicionado se sustenta até a iminência do choque, mesmo que o som seja interrompido antes (PARÉ; COLLINS, 2000). Nesse trabalho, gatos foram condicionados com uma sequência de 4 tons, seguida de uma pausa silente de 5 e mais 2 tons, ao final dos quais o choque era aplicado (FIGURA 5A). Após o condicionamento, a taxa de disparo dos neurônios registrados na LA duplicou não apenas durante a apresentação dos pré-tons mas também durante o período de silêncio e estiveram correlacionados a um aumento da pressão arterial, indicando que os animais se antecipavam à provável aplicação do choque (PARÉ; COLLINS, 2000) (FIGURA 5A e 5B). Além disso, pares de células registradas simultaneamente tiveram um aumento significativo na sincronização de seus disparos na faixa de frequência da banda teta (4-8 Hz), novamente tanto durante a apresentação dos pré-tons quanto no período de silêncio (PARÉ; COLLINS, 2000) (FIGURA 5C).

Neurônios piramidais glutamatérgicos da BLA têm características celulares intrínsecas que os tornam propensos a apresentarem flutuações do potencial de membrana a uma taxa coincidente com a banda teta (PAPE et al., 2005; PAPE; PARÉ; DRIESANG, 1998), o que leva a crer que esses ritmos podem gerados na própria BLA. A atividade conjunta de uma população dessas células, cada uma gerando correntes transmembrana pós-sinápticas excitatórias, promove flutuações na concentração iônica do meio extracelular que são percebidas nos eletrodos de registro como deflexões de voltagem que, em função do tempo, descrevem Potenciais de Campo Locais (LFP) (BUZSÁKI; ANASTASSIOU; KOCH, 2012). Essas flutuações geram variações cíclicas na excitabilidade neuronal que funcionam como janelas de oportunidade para disparos temporizados, um mecanismo que parece ser fundamental para a comunicação entre diferentes áreas do cérebro, inclusive a amígdala, e sua

integração em processos de memória associativa (FELL; AXMACHER, 2011). Ritmos de baixa frequência são considerados ideais para sincronizações a longa distância, entre estruturas remotas, ao passo que as de alta frequência refletem a ativação de circuitos locais de alta precisão temporal (FELL; AXMACHER, 2011).

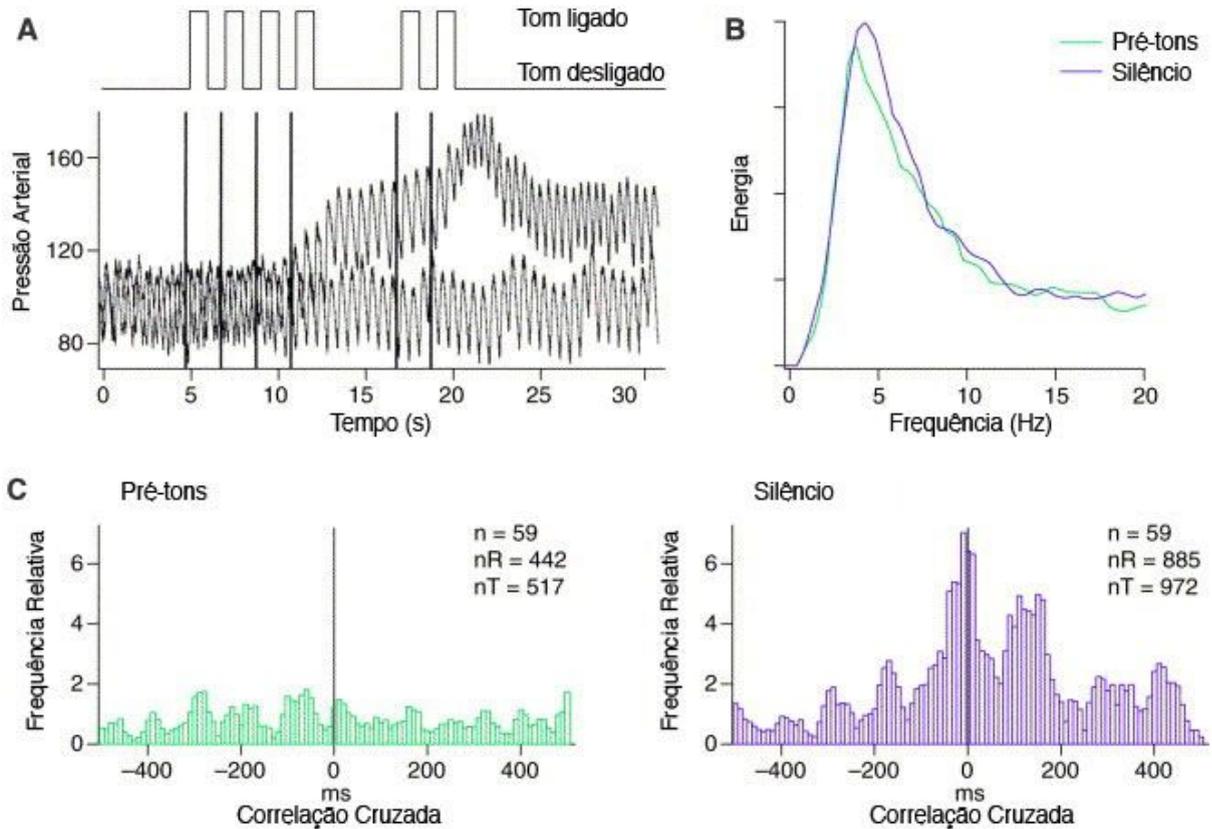


Figura 5 - Oscilação preditiva de neurônios da LA na banda de frequência teta. (A) Aumento da pressão arterial em gatos condicionados no período de silêncio imediatamente anterior à apresentação do US. (B) Aumento da energia na banda teta tanto durante a apresentação do CS quando no período silente entre as apresentações do CS e do US. (C) Correlação cruzada entre pares de neurônios disparando em sincronia na banda teta em ambos os períodos. Adaptado de (PARÉ; COLLINS; PELLETIER, 2002)

Esse parece ser o caso da atividade em teta na amígdala, já que em tarefas de condicionamento clássico ao medo observa-se um aumento na energia e sincronia nessa banda não apenas em seus circuitos intrínsecos, como descrito acima, mas também na sincronia entre a BLA e a região CA1 do hipocampo (SEIDENBECHER et al., 2003) (FIGURA 6 E-H). Esse efeito foi visto não apenas durante as rerepresentações do CS⁺ mas até mesmo, embora em menor intensidade, na presença de um CS⁻, revelando o estabelecimento de um processo robusto de facilitação da comunicação entre as duas áreas (SEIDENBECHER et al., 2003) (FIGURA 6 A-D).

O padrão de sincronização da BLA parece variar também de acordo com a área com a qual estabelece a comunicação. Duas regiões adjacentes do córtex prefrontal medial (mPFC) desempenham papéis opostos na regulação do comportamento de medo (VIDAL-GONZALEZ et al., 2006). A área infralímbica (IL) atua na extinção da memória aversiva através de conexões com as células intercalares, o que resulta na inibição das células de projeção da CeM. A região pré-límbica (PL) atua de maneira oposta, favorecendo a expressão do comportamento de congelamento através de eferências excitatórias nos neurônios da BA que projetam para CeM. Durante a evocação do aprendizado associativo em camundongos condicionados, oscilações em 4 Hz emergem no PL e são preditivas de ocorrências de congelamento (KARALIS et al., 2016). A inibição farmacológica dessa área suprime o comportamento e sua estimulação optogenética é suficiente para gerá-lo, mesmo na ausência do CS. A dinâmica dessa oscilação se mostrou independente da atividade em teta relacionada à comunicação amígdalo-hipocampal (KARALIS et al., 2016).

A comunicação com o mPFC se dá também em faixas de frequência altas, como a banda gama (40-120 Hz). Durante a expressão do comportamento de medo, há um aumento do acoplamento cruzado entre as atividades em teta e gama alta (70-120 Hz) nos circuitos intrínsecos da BLA, embora haja uma redução da energia da banda de alta frequência (STUJENSKE et al., 2014). Em ambientes seguros, por outro lado, o acoplamento dessa banda passa a ser dirigido pelo ritmo teta gerado no mPFC, evidenciando uma competição de diferentes osciladores de baixa frequência pelo direcionamento da atividade local na BLA em contextos distintos (STUJENSKE et al., 2014).

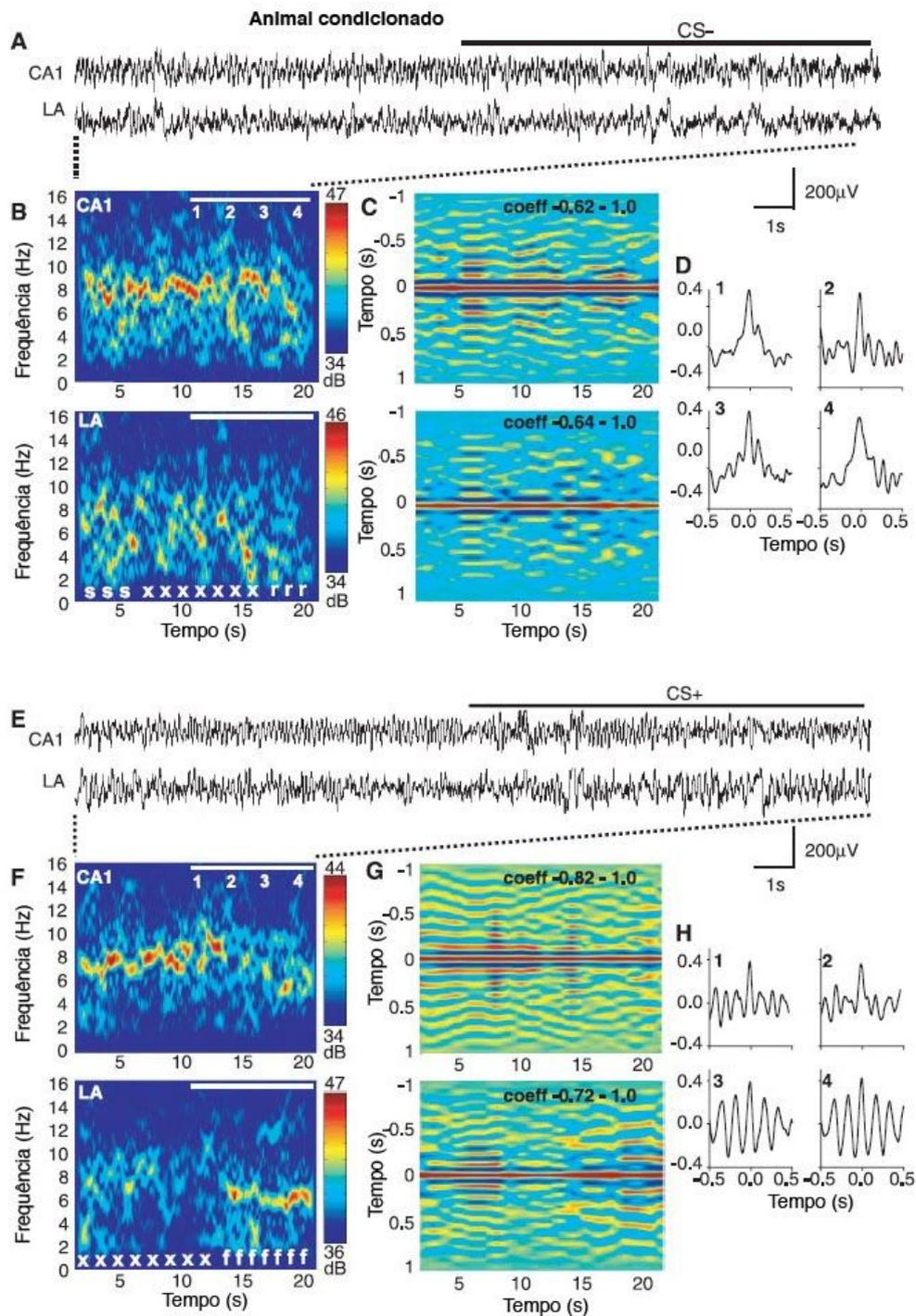


Figura 6 - Aumento de conectividade entre a região CA1 do Hipocampo e a BLA na banda teta durante tarefa após condicionamento ao medo. (A e E) Traçado do sinal eletrográfico original das duas áreas. (B e F) Espectrogramas mostrando o aumento da atividade na banda teta em CA1 durante apresentação do tanto do CS⁻ quanto do CS⁺ e na BLA sobretudo na apresentação do CS⁺, que está correlacionado com os episódios de congelamento (marcado com a letra f na borda inferior). (C, D, G e H) Autocorrelação da atividade de neurônios registrados nas duas áreas. Adaptado de (SEIDENBECHER et al., 2003)

A relação entre as atividades em baixa e alta frequência sugere a existência de uma comunicação de áreas remotas direcionando a atividade de circuitos locais. No caso descrito acima, diferentes fases do ciclo da onda teta funcionam como janelas de oportunidade para o aumento da probabilidade de disparos de alta frequência dos circuitos locais, com as oscilações gama de baixa frequência e alta frequência ocorrendo em diferentes pontos (STUJENSKE et al., 2014) (FIGURA 7C). Esse é um mecanismo de acoplamento fase-fase entre diferentes frequências (FIGURA 7D), uma vez que a maior ou menor probabilidade de disparo da onda gama é função do ângulo da fase em teta, ou seja, de sua posição no ciclo (FELL; AXMACHER, 2011) (FIGURA 7D). Em ambientes seguros e também durante o processo de extinção, em que o mPFC dirige o circuito local na BLA, existe não apenas uma sincronização de fase entre os circuitos como também um aumento da energia do circuito local (STUJENSKE et al., 2014), evidenciando um mecanismo de acoplamento fase-amplitude entre essas diferentes faixas de frequência (FELL; AXMACHER, 2011) (FIGURA 7D).

Embora os neurônios glutamatérgicos da BLA apresentem flutuações de potencial de membrana na faixa de frequência de teta, como visto, os mecanismos oscilatórios dessa região são fortemente modulados por sua atividade inibitória intrínseca. São várias as classe de interneurônios GABAérgicos presente na BLA, mas os mais numerosos são os positivos para a proteína ligante de cálcio parvalbumina (PV^+), que fazem sinapses perissomáticas e dendríticas proximais diretamente com os neurônios principais que projetam para a CeM (DUVARCI; PARE, 2014). A ativação das células PV^+ , portanto, seria capaz de impedir a expressão de comportamento de medo, o que de fato acontece (HELMSTETTER; BELLGOWAN, 1994). Além dos neurônios glutamatérgicos, as células PV^+ também fazem contato com interneurônios positivos para somatostatina (SOM^+), que por sua vez têm sinapses dendríticas com as células excitatórias (WOLFF et al., 2014). Esse arranjo permite um controle fino da janela temporal de integração entre CS e US. A chegada do estímulo CS ativa neurônios PV^+ , que por sua vez inibem os SOM^+ , desinibindo a atividade dendrítica e aumentando a resposta auditiva evocada. A chegada das projeções do US, no entanto, inibe ambos, aumentando ainda mais a resposta no soma das células piramidais (WOLFF et al., 2014). O perfil de disparos em alta frequência dos interneurônios PV^+ e a morfologia perissomática de suas sinapses com os neurônios glutamatérgicos as torna candidatas

potenciais a geradoras de ritmos gama. No entanto, sua participação mais evidente foi descrita na regulação de duas faixas de oscilações em teta que competem entre si pelo direcionamento do circuito em processos de extinção (6-12 Hz) ou aquisição (3-6 Hz) da memória de medo (DAVIS et al., 2017).

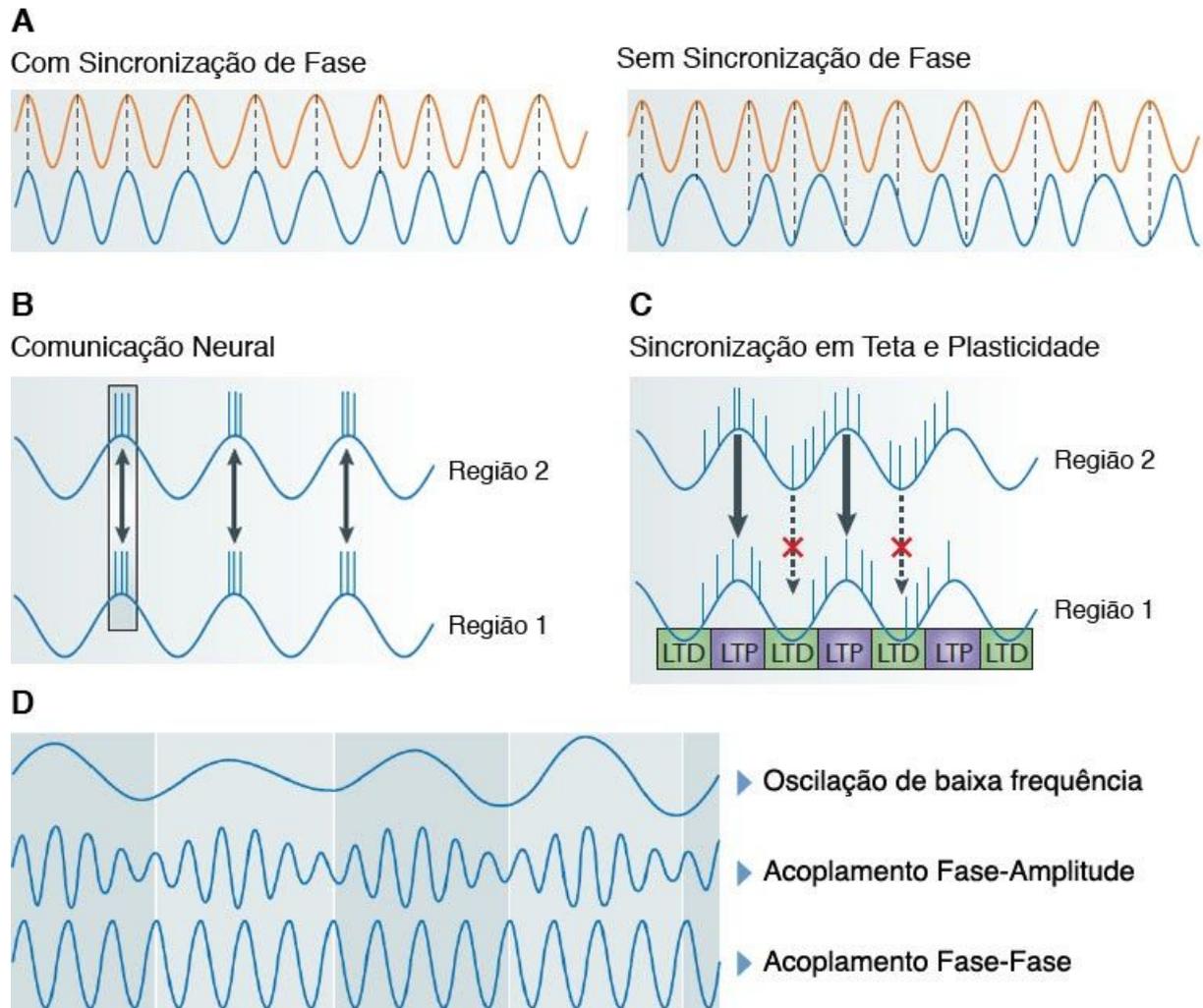


Figura 7 - Mecanismos de acoplamento entre oscilações de diferentes frequências. (A) Exemplos de fase relativa entre dois sinais com e sem acoplamento. (B) Comunicação neural entre duas regiões por disparos sincronizados pelas fases da onda lenta. (C) Sincronização e plasticidade entre duas regiões através de disparos no pico da onda teta. (D) Exemplos de acoplamento entre diferentes frequências. Adaptado de (FELL; AXMACHER, 2011).

Uma terceira classe de interneurônios, positivos para colecistoquinina (CCK⁺), também atua sobre neurônios principais que contribuem para a extinção do comportamento de medo. O efeito de sua ativação portanto é pró-comportamento de defesa, evidenciando uma orquestração pouco linear da participação de interneurônios gabaérgicos na geração de mecanismos, oscilatórios ou não, de memória associativa na BLA. Essa regulação não se limita à BLA, mas ganha contornos ainda mais sofisticados na CeA, onde os neurônios GABAérgicos são prevalentes. Um exemplo bastante ilustrativo desses mecanismos são as células ON e OFF presentes na CeL e seu papel na expressão do comportamento de medo (CIOCCHI et al., 2010). Elas se diferenciam em termos de marcadores genéticos, já que apenas as células CeL_{OFF} expressam a proteína quinase C delta (PKC δ), e padrão de ativação eletrofisiológica, uma vez que as células CeL_{ON} têm menor latência de resposta à apresentação do estímulo condicionado. Por sua posição no circuito, seu padrão de ativação também é oposto. A informação do CS vinda da BLA projeta diretamente sobre as CeL_{ON} ativando-os, mas de maneira indireta sobre as CeL_{OFF} através da modulação pelas células intercalares, causando um efeito final inibitório. Como os dois grupo de células se modulam reciprocamente, a menor latência das CeL_{ON} faz com que inibam as CeL_{OFF}, inibindo sua projeção para CeM, que por sua vez projeta livremente para a PAG (CIOCCHI et al., 2010; JANAK; TYE, 2015).

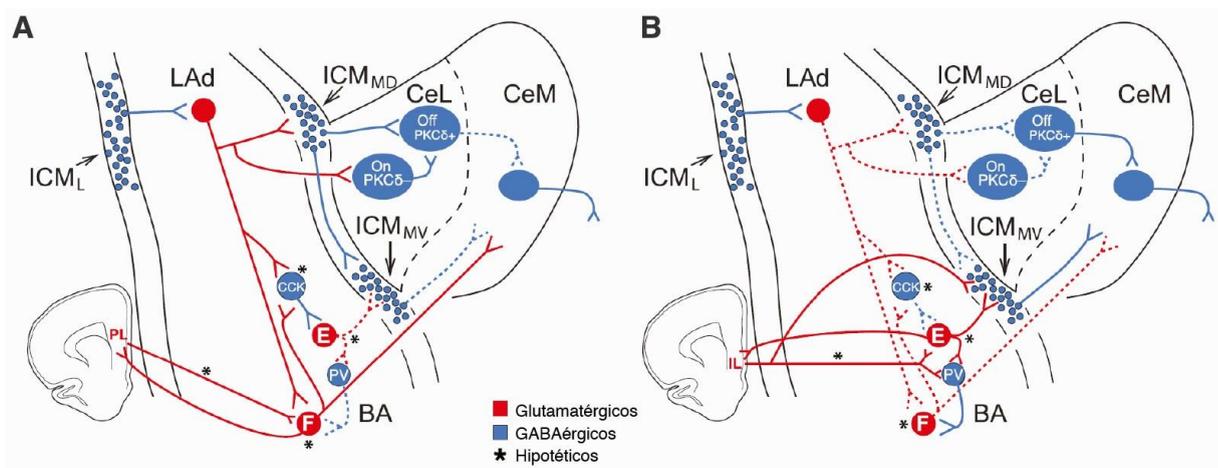


Figura 8 - Circuitos funcionais do condicionamento ao medo no Complexo Amigdalóide. (A) Circuito funcional ativado durante evocação da memória condicionada. (B) Circuito funcional ativado durante extinção da memória condicionada. Neurônios excitatórios em vermelho e inibitórios em azul. Adaptado de (DUVARCI; PARE, 2014).

1.5 Modulação Top-down

“O senhor vê: existe cachoeira; e pois? Mas cachoeira é barranco de chão, e água caindo por ele, retombando; o senhor consome essa água, ou desfaz o barranco, sobra cachoeira alguma?”

(Riobaldo Tatarana)

Os mecanismos envolvidos nos processos de memória associativa, tanto na sua aquisição como evocação, como visto na seção anterior, dependem da atividade integrada de diferentes estruturas cerebrais. Em várias delas, a evocação da relação entre CS e US depende tanto atividade induzida pelo estímulo de entrada quanto da reverberação de circuitos previamente envolvidos na consolidação da memória. O sucesso do aprendizado via condicionamento clássico depende, portanto, de dois fluxos de ativação neural: aquela que é diretamente evocada pelo estímulo e a que resulta da reverberação de redes neuronais internas de armazenamento de padrões associativos semelhantes (BUZSAKI, 2006; ENGEL; FRIES; SINGER, 2001; GILBERT; SIGMAN, 2007; VARELA et al., 2001).

De acordo com essa ideia, um mesmo estímulo sensorial, invariante em suas características físicas, pode induzir padrões de ativação neuronal bastante diferentes de acordo com a valência emocional associada, gerando estados internos transitórios que favorecem a execução de respostas comportamentais específicas. Esse modelo se aproxima bastante do conceito de “assembléias celulares”, que são redes difusas de neurônios recrutados em diferentes estruturas cerebrais, capazes de agir transitoriamente como um circuito fechado, gerando facilitação a outros sistemas (HEBB, 1949). A regulação dos mecanismos de aquisição de memória entre BLA e mPFC (KARALIS et al., 2016; STUJENSKE et al., 2014) e BLA e HIPO (LESTING et al., 2013) e de extinção entre BLA e mPFC (DAVIS et al., 2017; LESTING et al., 2013) são exemplos desses circuitos transitoriamente ativados.

A visão clássica da neurociência, até há alguns anos atrás, no entanto, descrevia a organização das vias sensoriais primárias não como circuitos fechados, mas de acordo com uma hierarquia linear em que a informação segue um fluxo direcional ascendente, através de

projeções de alimentação direta, até que os padrões de representação do estímulo sejam projetados no córtex daquela modalidade sensorial (GILBERT; SIGMAN, 2007). De acordo com esse modelo, o cérebro seria um órgão passivo à espera de uma estimulação externa e só faria sentido pensar em padrões diversos de respostas evocadas por um estímulo invariante se elas fossem medidas em estados cerebrais distintos, como nos diferentes estágios do sono, durante a vigília ou sob anestesia. Nesses casos, a atividade neuronal é altamente influenciada pelos estados internos do sistema e essencialmente independente da experiência prévia do organismo (BUZSAKI, 2006; FONTANINI; KATZ, 2008; GILBERT; SIGMAN, 2007). Um forte conjunto de evidências, no entanto, vem revendo esse modelo e mostrando a fundamental importância de projeções descendentes retroalimentadas na modulação ativa das vias sensoriais primárias (GILBERT; SIGMAN, 2007). De acordo com essa concepção, as vias ascendentes (*bottom-up*) e descendentes (*top-down*) se modulam reciprocamente, de maneira ativa e contínua, e a representação do estímulo seria o padrão de ativação resultante dessa interação em diferentes áreas do encéfalo (BUZSAKI, 2006; GROSSBERG, 1980; VARELA et al., 2001). O viés anatômico de uma “impressão” cortical do estímulo daria lugar, assim, a um padrão dinâmico de conexões entre circuitos (VARELA et al., 2001), ao longo de uma atividade reverberatória contínua, em que o aspecto temporal passaria a ter um papel tão crucial quanto o anatômico (BUZSAKI, 2006). De acordo com essa perspectiva, a percepção seria um processo ativo e altamente seletivo, constantemente dependente da modulação mútua entre estados internos do organismo e a atividade evocada por estímulos externos. A vantagem adaptativa desse modelo é a possibilidade de gerar expectativas e previsões probabilísticas acerca de eventos sensoriais iminentes em função das memórias de experiências passadas (BAR, 2009; ENGEL; FRIES; SINGER, 2001; KVERAGA; GHUMAN; BAR, 2007), conforme ocorre nos processos de aprendizado associativo, incluindo o condicionamento clássico ao medo (PARÉ; COLLINS, 2000).

Grande parte do esforço recente para entender os fundamentos dessa natureza construtiva da percepção tem sido colocada nos circuitos dinâmicos formados pela modulação recíproca entre áreas corticais e o tálamo (BARCZAK et al., 2018; SIROTA et al., 2008) e, como visto anteriormente, entre essas áreas e estruturas límbicas (DAVIS et al., 2017; KARALIS et al., 2016; LESTING et al., 2013; LIKHTIK et al., 2014; STUJENSKE et al., 2014; VIDAL-GONZALEZ et al., 2006). Embora a amígdala apresente essas projeções

recíprocas funcionais com o córtex e outras, com áreas límbicas, que influenciam o processo de condicionamento ao medo (SEIDENBECHER et al., 2003), do ponto de vista adaptativo faz sentido imaginar essa estrutura como uma fonte de modulação em si, capaz de facilitar a entrada e processamento de informações sensoriais emocionalmente relevantes e de formar circuitos de resposta rápida com áreas talâmicas ou ainda mais caudais, no tronco encefálico, como visto no aumento da taxa de disparos evocados por um estímulo condicionado a partir de projeções talâmicas do núcleo geniculado medial (QUIRK; REPA; LEDOUX, 1995).

1.6 Colículo Inferior

*“De cada vez, o senhor vira o corpo num lado: e olha, escuta.
Qualquer barulho sem tento, que se faz, verte perigo.”*

(Riobaldo Tatarana)

Dentre as eferências de saída do complexo amigdalóide que não partem da CeA, está uma projeção direta da BA para o colículo inferior (CI), uma estrutura localizado no mesencéfalo e que é considerada como o primeiro centro de integração e processamento da via auditiva. Grande parte das fibras tanto ascendentes quanto descendentes dessa via convergem nessa estrutura, tornando-o um raro alvo de confluência de processamento *top-down* e *bottom-up* (MALMIERCA, 2004).



Figura 9 - Localização do Colículo Inferior no cérebro de ratos

Vários estudos vêm confrontando a idéia outrora válida de que o CI e outros núcleos do tronco encefálico são apenas relés de passagem da informação auditiva. (BAJO et al., 2010; MAREN; YAP; GOOSENS, 2001; NOBRE, 2013). Alguns parâmetros dos estímulos sensoriais são processados já nessas primeiras estações da via sensorial (BENSMAIA et al.,

2008). Alguns deles recebem projeções eferentes massivas de áreas de processamento de mais alta ordem de complexidade, como córtices sensoriais primários e associativos (BAJO; KING, 2012; WINER et al., 2002), o que permite supor que a via auditiva está sujeita a modulação dependente de experiência por vias retroalimentadas desde seus primeiros estágios, ainda no tronco encefálico.

Neurônios do CI participam da detecção de novidades através da modulação de sua frequência de disparo pela probabilidade de ocorrência de diferentes estímulos auditivos em experimentos baseados no paradigma *oddball* (MALMIERCA et al., 2009; PÉREZ-GONZÁLEZ; MALMIERCA; COVEY, 2005). Experimentos de condicionamento clássico revelaram que tanto o padrão de respostas evocadas (BIRT; NIENHUIS; OLDS, 1979; DISTERHOFT; STUART, 1977; JI; SUGA, 2009; MARK; HALL, 1967) quanto a própria organização tonotópica do CI (GONZALEZ-LIMA; AGUDO, 1990) podem ser alteradas em função da valência do estímulo não-condicionado (apetitivo ou aversivo). Parâmetros de resposta eletrofisiológica, como a taxa e a latência de disparo de neurônios do CI, estão correlacionados ao desempenho comportamental resultante do condicionamento, muito embora em uma tarefa de condicionamento operante auditivo em primatas (METZGER et al., 2006).

As alterações intrínsecas ao CI descritas acima seguem em alimentação direta até o NGM e posteriormente à LA, sítio de associação e potenciação do estímulo auditivo condicionado, que por sua vez projeta para a BA, de onde partem eferências diretas para o CI (MARSH et al., 2002), algo aparentemente incomum em se tratando de projeções amigdalares para estruturas sensoriais de tronco encefálico. Teríamos, assim, um circuito fechado e eventualmente funcional durante processos de condicionamento clássico. De fato, a inativação da BLA é capaz de promover alterações no padrão de respostas evocadas no CI (NOBRE, 2013; NOBRE; BRANDÃO, 2011) e o CI está envolvido no processamento de sons aversivos em tarefas de condicionamento clássico ao medo (LEDOUX; SAKAGUCHI; REIS, 1984; NOBRE; CABRAL; BRANDÃO, 2010), indicando uma forte conectividade funcional entre essas duas estruturas nesse tipo de paradigma.

De fato, em diferentes espécies de mamíferos o CI é alvo de várias projeções descendentes originárias de estruturas superiores da via auditiva, como o córtex auditivo

(Adams, 1980; Bajo & King, 2012; Diamond, Jones, & Powell, 1969; Faye-Lund, 1985; FitzPatrick & Imig, 1978), em especial células piramidais da camada V do córtex auditivo primário (A1), e outras áreas do lobo temporal (Beyerl, 1978; Coleman & Clerici, 1987), além de estruturas auditivas subcorticais, como o núcleo geniculado medial (Kuwabara & Zook, 2000; Senatorov & Hu, 2002). Estruturas não-auditivas também projetam ao CI, como o córtex visual (Cooper & Young, 1976), o colículo superior (Doubell, Baron, Skaliora, & King, 2000; Harting, 1977) e áreas límbicas, em especial a amígdala basal (BA), conforme observado em morcegos (Marsh, Fuzessery, Grose, & Wenstrup, 2002). Essa última projeção mostra um vínculo particularmente interessante, pois o complexo basolateral da amígdala está classicamente envolvido em tarefas de condicionamento ao medo [refs revisão] e a lesão do CI, bem como do NGM, impedem a associação de um estímulo auditivo em uma tarefa desse tipo (LeDoux, Sakaguchi, & Reis, 1984).

1.7 Respostas Evocadas em Regime Permanente

“Atrás de nós, eu ouvia os passos postos da grande cavalaria, o regular, esse empurro continuado.”

(Riobaldo Tatarana)

Grande parte dos estímulos acústicos utilizados em tarefas de condicionamento clássico ao medo foi composta por cliques sonoros de curtíssima duração. Os potenciais evocados por esses estímulos são igualmente transitórios e em geral dependentes apenas da via de entrada. Processos plásticos, ainda assim, podem ser analisados a partir de alterações de parâmetros eletrofisiológicos como latência de resposta e amplitude em função do condicionamento. No entanto, essas informações nos permitem conhecer apenas os estágios inicial e final do sistema, mas não os processos que intermediários.

Outra desvantagem desse tipo de resposta para o estudo da dinâmica de associação entre áreas diferentes é que elas são muito curtas para sobrepor temporalmente a atividade de dois circuitos. Uma forma de contornar essa limitação seria a apresentação de uma sequência desses estímulos, mas ainda assim a taxa de apresentação, por maior que fosse, não evitaria que a resposta evocada por um estímulo terminasse antes da apresentação do próximo (BIACABE et al., 2001; SHAW, 1992). A escala temporal de alterações neuronais pode ser da ordem de dezenas de milissegundos e o impacto sobre a conectividade dos circuitos pode estar na mesma escala temporal (BUZSAKI, 2006; VARELA et al., 2001). Portanto, é possível que a segunda apresentação de um estímulo durante uma tarefa já encontre um circuito significativamente alterado pelo primeiro.

A utilização de tons puros de longa duração poderia contornar essa limitação, já que têm duração suficiente para sobrepor temporalmente a informação ascendente de alimentação direta e a descendente retroalimentada por estruturas mais rostrais (LESTING et al., 2013). Essa sobreposição, no entanto, se dá de forma que a contribuição de cada via para o padrão de atividade resultante é praticamente indistinguível, do ponto de vista espectral, da atividade intrínseca dos circuitos analisados.

Para avaliar a contribuição da atividade sensorial aos mecanismos de memória associativa, seria interessante que os estímulos tivessem um componente oscilatório embutido que pudesse ser comparado em termos de sincronia e acoplamento com os ritmos endógenas de estruturas como a amígdala basolateral. Estímulos estacionários contínuos vêm sendo utilizados para gerar potenciais oscilatórios sustentados de longa duração, abrindo um campo de pesquisa de enorme potencial para a integração de circuitos com atividade reverberatória no cérebro.

As primeiras respostas desse tipo foram observadas na via auditiva (GALAMBOS; MAKEIG; TALMACHOFF, 1981). Nessa modalidade, que vem liderando as pesquisas com a técnica desde então (PICTON et al., 2003), os estímulos correspondem geralmente a um tom puro modulado em amplitude por um envelope senoidal de frequência conhecida. A natureza das respostas gerou alguma controvérsia por serem consideradas explicáveis como a somação linear de respostas transitórias e não por arrasto oscilatório (ZHANG et al., 2013). No entanto, existem diferenças nos dois tipos de respostas, sobretudo pelo fato de que potenciais transitórios correlacionam aos seus estímulos geradores essencialmente através de da amplitude do sinal, ao passo que as respostas evocadas em regime permanente (REARPs) o fazem por sincronia de fase (ZHANG et al., 2013), o que representa um grande trunfo no estudo de interações entre atividade evocada e redes oscilatórias intrínsecas.

A contribuição das REARPs para esse tipo de estudo reside no fato de que seu componente oscilatório, induzido pelo envelope de modulação do sinal, é capaz de arrastar (*entrain*) a atividade de populações neuronais recrutadas pelo estímulo tanto nas vias sensoriais quanto potencialmente em estruturas associativas capazes de gerar potenciais evocados auditivas, como a LA (FIGURA 9). Esse arrasto gera um componente de frequência na faixa de modulação do sinal de entrada que funciona como uma assinatura eletrográfica facilmente rastreável por análise espectral do sinal no domínio da frequência e por isso as REARPs têm sido utilizadas no monitoramento de vias recrutadas por estímulos específicos (BROWN; NORCIA, 1997; FUJIKI; JOUSMÄKI; HARI, 2002; WEISZ et al., 2007).

Além disso, as REARPs oferecem uma escala temporal que permite observar a sobreposição contínua entre dois fluxos de informação: o sinal invariante de entrada e sua modulação pelo fluxo descendente de retroalimentação do sistema (GALAMBOS; MAKEIG;

TALMACHOFF, 1981; PICTON et al., 2003). Neste cenário, a coerência entre o potencial das REARPs e o envelope de modulação da amplitude do estímulo refletiria a variabilidade temporal desse estímulo (KALITZIN et al., 2002) como um correlato de comunicação entre áreas. A energia dos potenciais evocados, por sua vez, seria um reflexo da excitabilidade de neurônios alvo a partir de aferências pré-sinápticas (PASTOR et al., 2002). Por fim, a fase do de acoplamento entre estímulo e resposta retroalimentada indicaria o atraso da resposta em relação ao estímulo (KUWADA et al., 2002), de forma similar à latência dos potenciais evocados transitórios. Alguns desses parâmetros, como energia e fase, são alterados por tarefas de aprendizado auditivo em humanos (BOSNYAK; EATON; ROBERTS, 2004; GANDER; BOSNYAK; ROBERTS, 2010; ROBERTS; BOSNYAK; THOMPSON, 2012), sugerindo que outros paradigmas de aprendizado associativo, como o CACM, também podem influenciá-los. As REARPs podem assim potencialmente complementar os achados obtidos até hoje com potenciais evocados transitórios (ZHANG et al., 2013), oferecendo um novo horizonte de análises de processamento de memórias associativas.

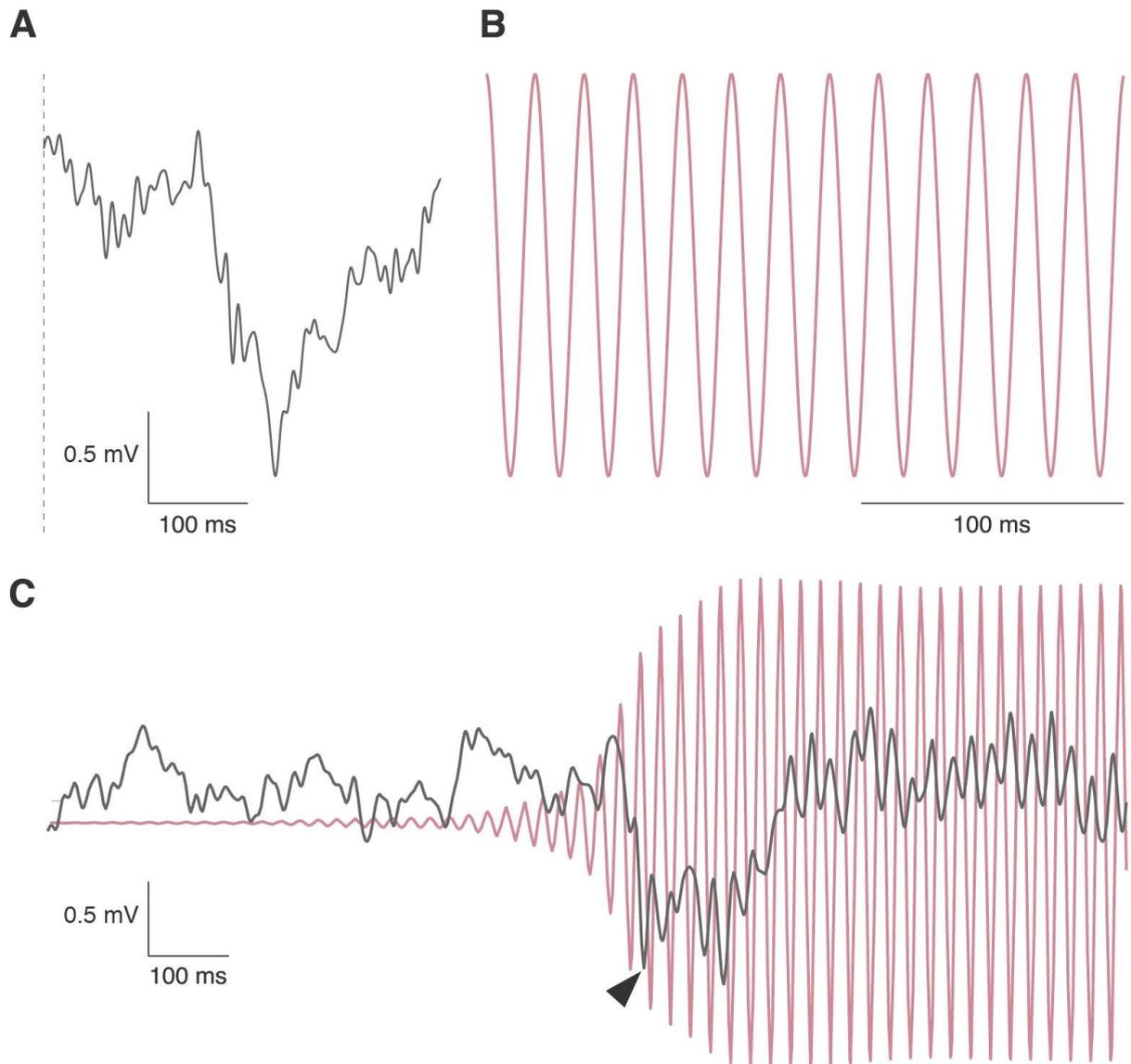


Figura 10 - Potenciais evocados auditivos transitório e em regime permanente. (A) Potencial auditivo transitório registrado no Colículo Inferior. (B) Trecho de envelope da moduladora em 53,71 Hz. (C) Trecho correspondente ao início da apresentação do estímulo em que o envelope de modulação começa a arrastar a atividade em curso no Colículo Inferior. Cabeça de seta: deflexão negativa característica do potencial evocado transitório observado no início da aplicação do estímulo estacionário.

1.8 Estudo das Respostas Evocadas em Regime Permanente no Colículo Inferior no Condicionamento Auditivo Clássico ao Medo

“Zé Bebelo carecia de rédeas de um outro diverso poder e forte sentir, que tomasse conta, desse rumo a ele”

(Riobaldo Tatarana)

Para avaliar essa hipótese e a viabilidade das REARPs como ferramenta de investigação da interação entre a memória associativa e o processamento sensorial, nosso grupo submeteu um grupo de 10 ratos Wistar com eletrodos implantados no CI para registro de potenciais de campo local (LFP) a um protocolo de condicionamento ao medo. O grupo experimental (n=5) recebeu 5 pareamentos entre estímulos condicionados (CS) auditivos e choques nas patas (400 μ A, 2s) enquanto o grupo controle (n=5) recebeu o mesmo número de estímulos mas sem o pareamento temporal. Os estímulos auditivos foram compostos por tons puros de 10 kHz modulados em amplitude a uma frequência de 53,71 Hz, com 85 dB de intensidade e 30 s de duração. Foram avaliadas as respostas no CI e o comportamento defensivo de congelamento dos animais em sessões 24 hs antes (pré-condicionamento) e 24 hs após (teste) o condicionamento. Os resultados mostraram que o aumento do comportamento de congelamento por parte dos animais re-expostos ao CS⁺ foi acompanhado de um aumento tanto do acoplamento da fase relativa ao estímulo de entrada quanto da amplitude das REARPs, sugerindo um processo de sincronização neural induzido pelo processo de condicionamento (LOCKMANN; MOURÃO; MORAES, 2017).

Esse trabalho confirma a alteração dos parâmetros de fase e amplitude das REARPs após uma tarefa de CACM. Esta evidência, em conjunto com as outras apresentadas anteriormente, sugere que a amígdala -- especificamente a BLA -- pode desempenhar um papel fundamental na modulação dessas respostas no CI, de modo que a inibição dessa estrutura prejudique o arrasto do envelope de modulação do CS relacionado ao CACM no CI.

1.9 Hipótese do trabalho

“Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa.”

(Riobaldo Tatarana)

No presente trabalho, portanto, levantamos a hipótese de que o aumento da sincronia da fase relativa e da amplitude das REARPs pelo CS são dependentes da atividade modulatória da BLA e que a inibição desta estrutura atenuará esses efeitos.

2. JUSTIFICATIVA

A memória associativa é um processo cognitivo fundamental que está na base de nossa capacidade de interagir adequadamente com o ambiente. Ao longo das últimas décadas tivemos um formidável avanço no entendimento dos processos neurofisiológicos subjacentes a esse processo e seu papel no comportamento, mas ainda estamos apenas começando a compreender seu impacto na regulação da própria experiência sensorial e subjetiva do mundo. A ideia da percepção como um processo ativo é relativamente recente dentro das neurociências. Entender a dinâmica de interação de redes entre processos mnemônicos e sensoriais passa a ser crucial para a compreensão do próprio funcionamento do cérebro e de sua regulação sobre o comportamento. Os processos de memória, pelo menos de um ponto de vista adaptativo, talvez tenham mais a ver com uma antecipação probabilística do futuro imediato do que com uma lembrança do passado remoto.

Entre essas duas frentes de processamento do fluxo de informação neural, o mnemônico e o sensorial, existe um componente modulatório que chamamos de emoções que se torna indispensável ao processo na medida em que possui a capacidade de atribuir valência aos estímulos, ou seja, definir se com eles devemos criar vínculos ou nos afastar. Compreender os mecanismos básicos de integração sensório-motora emocionalmente modulados pode ajudar a lançar luz não apenas sobre a própria fisiologia do próprio comportamento mas também sobre seus aspectos clínicos e potencial impacto sobre distúrbios cognitivos e/ou emocionais.

A relevância deste trabalho está na consolidação e ampliação do uso de respostas evocadas em regime permanente como uma ferramenta que entendemos ser adequada a este tipo de análise prospectiva da dinâmica de integração e conectividade de circuitos neuronais na formação de memórias e na regulação do comportamento. Uma vez estabelecida, uma ampla linha de investigação se abre adiante.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é investigar a participação do núcleo basolateral da amígdala na dinâmica de alterações dos parâmetros de fase e amplitude das respostas evocadas em regime permanente no colículo inferior durante uma tarefa de condicionamento clássico ao medo e avaliar a interação entre as vias sensoriais ascendentes e associativas descendentes na modulação dessas alterações.

3.1 Objetivos específicos

1. Confirmar as alterações na fase e na amplitude das REARPs medidas no CI em decorrência de aprendizado associativo;
2. Analisar a dinâmica temporal dessas alterações sob efeito da inibição da BLA para verificar sua participação na geração desses fenômenos;
3. Confirmar a geração de oscilações na banda teta na BLA decorrentes do processo de condicionamento clássico ao medo;
4. Investigar a existência de mecanismos de acoplamento entre a banda teta na BLA e o envelope da moduladora das REARPs no CI como forma de modulação *top-down* do processamento sensorial e formação de memórias associativas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

“O diabo na rua, no meio do redemunho...”

(Riobaldo Tatarana)

4.1 Diretrizes éticas

Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Experimentação e Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo nº 360/2015. Os experimentadores se mantiveram atentos ao maior cuidado possível no manejo dos animais durante os experimentos e buscaram sempre e por todos os meios disponíveis evitar submetê-los a dor ou sofrimento. Além disso, o desenho experimental foi feito de forma a utilizar o menor número possível de animais. As diretrizes do CEUA-UFMG estão de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e da *Behavior Guidelines for Animal Experimentation* para o cuidado e uso de animais em pesquisa.

4.2 Animais experimentais

Os experimentos foram realizados com 14 ratos Wistar machos, com peso entre 290 - 320 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO2) e mantidos em ambiente controlado, com ciclos de 12 por 12 horas de claro e escuro, acesso livre a ração e água e à temperatura de 22 ± 2 ° C.

4.3 Cirurgia de implante de eletrodos e cânulas

Os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina (80 mg / Kg) e xilazina (15 mg / Kg) por via intraperitoneal (i.p.). Após a confirmação do efeito pela ausência de reflexos de dor, a superfície da cabeça foi tricotomizada e os animais foram posicionados em aparelho estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, IL). Os reflexos da dor foram monitorados durante a cirurgia e doses suplementares de ketamina (20 mg/kg) foram administradas sempre

que necessário. Após assepsia com solução de povidona-iodo (7,5%, tópica) e anestesia local com cloridrato de lidocaína + epinefrina [1% (p/vol), 7 mg/kg], foi feita uma incisão no couro cabeludo para expor o crânio.

Eletrodos monopolares para registro eletrofisiológico foram feitos de fios de aço inoxidável revestidos de teflon (0,005 pol., Modelo 791400, AM Systems Inc., Carlsborg, WA, Estados Unidos). Dois deles foram passados e fixados através de um tubo de sílica (0,008 pol. DI x 0,014 pol. DE), para fornecer estabilidade mecânica (FIGURA 11A). Os eletrodos foram defasados de 0,5 mm no sentido DV. Os eletrodos foram posicionados nas coordenadas mediolaterais do CI esquerdo (AP: 9,0 mm, ML: -1,4 mm) (PAXINOS; WATSON, 2006) e descido lentamente, através de um orifício previamente perfurado no crânio por craniotomia buscando como alvo (DV: -4,0 mm) a porção do núcleo central do IC que apresenta as melhores respostas a sons de alta frequência, incluindo a frequência portadora escolhida do estímulo condicionado (10 kHz) (CLOPTON; WINFIELD, 1973; HUANG; FEX, 1986; MALMIERCA et al., 2008). O arranjo foi descido até que a ponta do eletrodo mais dorsal atingisse -3,5 mm e a partir daí era avançado de 0,5 em 0,5 mm e a cada parada o potencial transitório evocado por palmas era monitorado para buscar a melhor relação sinal-ruído.

Para as injeções de muscimol e salina e registro da atividade da BLA, foram construídos arranjos de cânulas-guia (22 G, 13 mm) por dentro das quais foram passados fios iguais aos dos eletrodos para o CI. Pelo lado externo, o fio foi dobrado e fixado à cânula por uma luva de silicone (FIGURA 11A). Na outra extremidade, a ponta de registro do eletrodos extrapolou em 1 mm a da cânula. Os arranjos foram inseridas bilateralmente por orifícios previamente perfurados no crânio por craniotomia nas coordenadas da BLA (AP: 2,8 mm, ML: 5,0 e -5,0 mm) e descidos lentamente até a coordenada dorsoventral (DV: 8,4 mm). Os arranjos de eletrodos e cânulas foram fixados ao crânio com cimento de zinco (FIGURA 11B).

Parafusos de aço inoxidável foram implantados nos ossos nasais como eletrodos de referência (0 V) e terra com fios de aço inoxidável soldados a eles. Os fios dos eletrodos e parafusos foram soldados às vias de um terminal RJ-12 de 6 vias (FIGURA 11C). Um terceiro parafuso foi fixado no osso parietal direito para auxiliar na estabilidade do capacete de

acrílico dental, que foi aplicado sobre o crânio para fixar todo o conjunto (FIGURA 11B, direita).

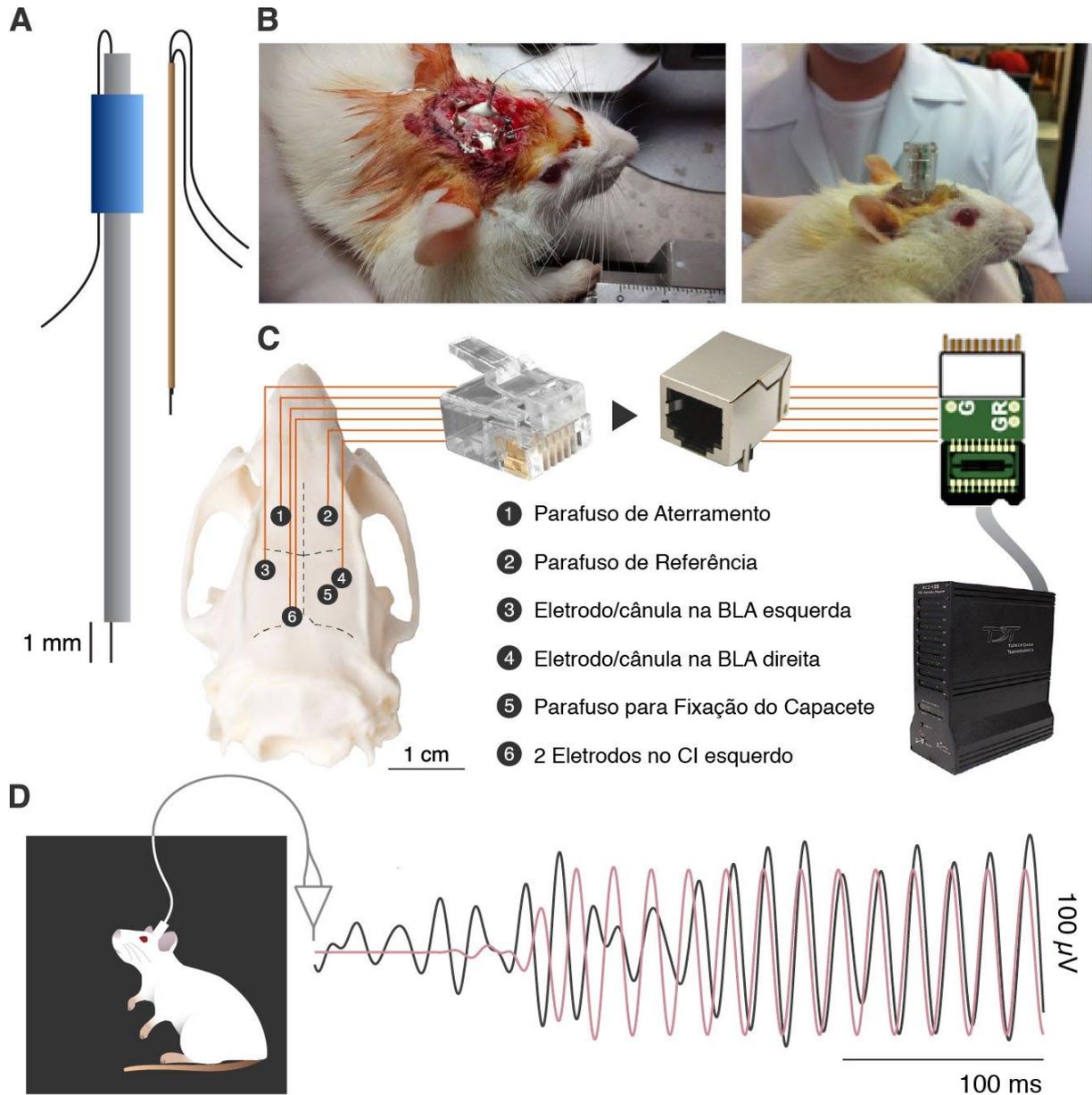


Figura 11 - Cirurgia de implante de eletrodos e *setup* de registros eletrofisiológicos (A) Esquema do arranjo cânula-eletros para microinjeção e registros na BLA (direita) e de eletrodos para registro no CI (esquerda). (B) Animal experimental com cânulas e eletrodos implantados durante a cirurgia (esquerda) e após, com o capacete já pronto (direita). (C) Esquema dos pontos de implante e fixação de parafusos sobre um crânio de rato, soldas no terminal RJ-12, conexão com RJ-12 fêmea acoplado ao *headstage* e conectados ao amplificador de sinais bioelétricos. (D) Esquema de animal na caixa de comportamento sendo registrado com sinal eletrofisiológico apresentando arrasto por uma REARP.

Após a cirurgia, os animais foram tratados profilaticamente com coquetel antibiótico de amplo espectro (Pentabiótico® Zoetis Fort Dodge; 19 mg / kg im) e anti-inflamatório (Banamine®, 2,5 mg / kg sc) e foram mantidos em recuperação por um período de sete dias.

4.4 Histologia

Depois de cumprido todo o protocolo experimental, os animais foram anestesiados (uretana 14% p/v; 10 mL/kg) e uma corrente elétrica (2mA durante 2 segundos) foi aplicada em cada eletrodo de registro para gerar uma pequena lesão eletrolítica no entorno de suas pontas para facilitar a localização nas lâminas histológicas. Em seguida, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina tamponada de fosfato (PBS) seguida de paraformaldeído em PBS (PFA, 4% p/v). Os cérebros foram removidos, pós-fixados em PFA, transferidos para uma solução de sacarose-PBS (30% p/v) e mantidos a 4° C. As seções coronais e parassagitais (50 µm) foram feitas em criostato (Leica Biosystems) e as fatias do cérebro foram coradas com uma solução de vermelho neutro. As posições de colocação dos eletrodos e cânulas foram verificados por fotomicrografias das fatias histológicas (aumento de 0,8x).

4.5 Condicionamento Auditivo Clássico ao Medo (CACM)

O CS consistiu de um tom puro de 10 kHz, com duração de 30 s, modulado em amplitude por uma onda senoidal de 53,71 Hz (100% de profundidade de modulação) (LOCKMANN; MOURÃO; MORAES, 2017; PINTO et al., 2017, 2019) e ajustado a 85 dB SPL no centro superior da caixa (decibelímetro Brüel & Kjaer tipo 2238) (MALMIERCA et al., 2008; MEEREN et al., 2001). O CS foi gerado por uma caixa de condicionamento personalizada (AMARAL-JÚNIOR and MOURÃO et al., 2019), amplificado por um aparelho comercial (AB100, 100 WRMS, 4 Ω, NCA) e reproduzido por um alto-falante (ST304, 40 WRMS, 8 Ω, Selenium Super Tweeter) posicionado no topo da caixa.

4.5.1 Parte I: Estímulo Condicionado (CS)

O CACM foi realizada com 10 animais em três dias consecutivos em dois contextos diferentes para evitar uma possível contaminação por condicionamento contextual. No primeiro dia (pré-condicionamento), os animais foram expostos a uma sequência de 5 apresentações do CS (intervalos pseudo-aleatórios não superiores a 120 s) no contexto A, que consistia em uma caixa de acrílico preto de 30 x 20 x 25 cm, com uma face transparente e odorizado com uma solução de álcool a 10% (FIGURA 12).

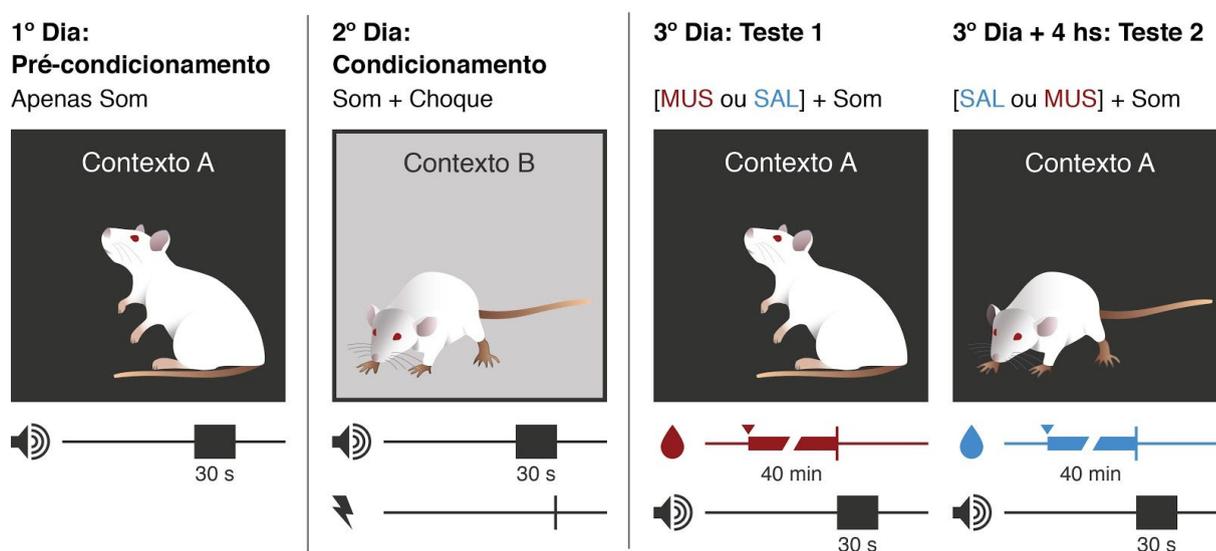


Figura 12 - Protocolo experimental de condicionamento clássico ao medo associado do tratamento com muscimol e salina.

No segundo dia (condicionamento), os animais foram expostos à mesma sequência de 5 estímulos de CS do primeiro dia, mas no contexto B, uma caixa de acrílico transparente de 23 x 23 x 23 cm, odorizada com uma solução de ácido acético a 1%. Durante a sessão de condicionamento, cada apresentação do CS foi pareada com o estímulo não condicionado (US), que consistia em uma corrente de 0,4 mA aplicada através de barras de metal no chão da caixa durante os últimos 2 s de apresentação do CS (LOCKMANN; MOURÃO; MORAES, 2017) (FIGURA 12).

No terceiro dia (teste), 24 horas após a sessão de condicionamento, os animais foram aleatoriamente designados para serem tratados com 0,5 µL de muscimol (5 mg/mL) ou 0,5 µL de solução veicular (solução salina, 0,9% p/v) injetados na BLA. Eles foram contidos com cuidado e uma cânula de infusão (30 G, 8 mm) foi inserida na cânula guia até atingir 1 mm abaixo de sua extremidade inferior. As drogas foram infundidas com uma seringa de 10 µL (Hamilton, EUA) conectada a uma bomba de microinfusão ajustada a uma vazão de 15 mL/h. Após a infusão, a cânula de injeção foi deixada no local por mais 1 minuto para evitar o refluxo da droga. Após 40 minutos, os animais foram submetidos novamente a um procedimento idêntico ao de pré-condicionamento no contexto A para verificar a retenção da memória associativa entre o CS e o US (FIGURA 12).

Após o término da primeira sessão de teste, os animais foram deixados em repouso por mais 4 horas (portanto, mais de 5 horas após a primeira injeção) para aguardar a recuperação da atividade suprimida pela ação do muscimol (ARIKAN et al., 2002). Os animais foram então novamente submetidos ao protocolo de injeção de drogas e teste de comportamento, com os animais previamente tratados com muscimol sendo agora tratados com solução salina e vice-versa (FIGURA 12).

As sessões foram gravadas por uma câmera montada em frente à caixa e os vídeos foram analisados por um examinador cego às condições experimentais. O comportamento de congelamento foi definido como a completa ausência de movimentos, com exceção da respiração, por no mínimo 2 s. Os resultados foram expressos como a porcentagem de congelamento em relação ao tempo total de cada apresentação do estímulo sonoro (CURZON; RUSTAY; BROWMAN, 2009). Períodos fora da apresentação do estímulo não foram considerados.

4.5.2 Parte II: Estímulo Neutro

Para o teste do NS, cinco animais foram submetidos ao mesmo protocolo descrito acima, mas sem passar pela sessão de condicionamento. Ou seja, no primeiro dia foram submetidos às sessões de pré-condicionamento e, no segundo, foram diretamente submetidos às sessões de reapresentação do som com injeção das drogas (FIGURA 13).

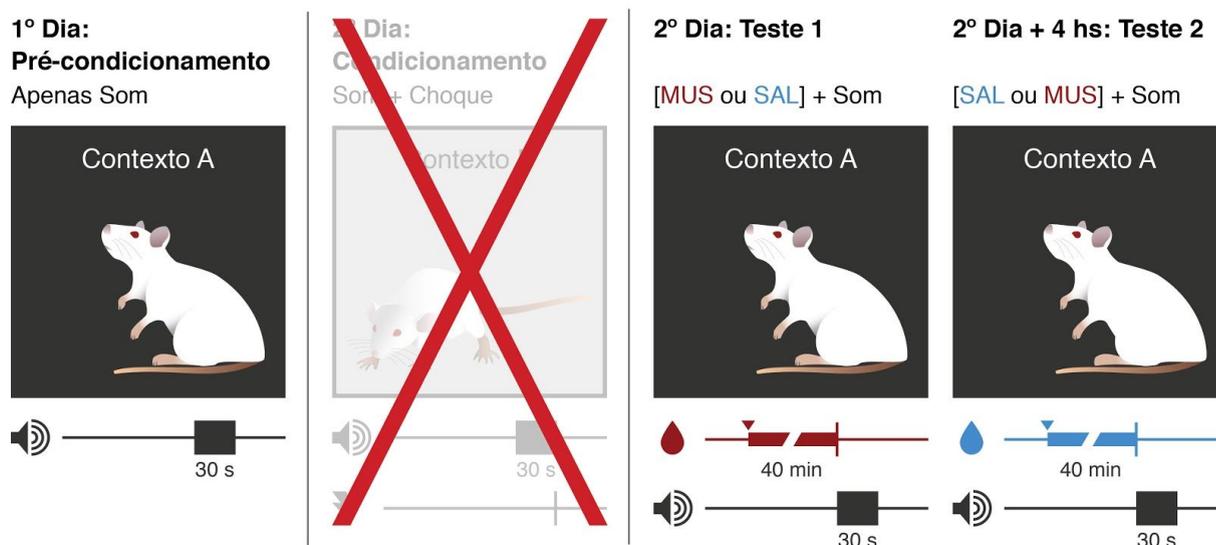


Figura 13 - Protocolo experimental de apresentação do estímulo neutro (NS) associado do tratamento com muscimol e salina.

4.6 Registros eletrofisiológicos e análise de dados

Antes das sessões de registro, o terminal RJ-12 implantado no crânio do animal experimental era conectado a um conjunto previamente construído formado por um terminal RJ-12 fêmea acoplado a um estágio de ganho unitário pré-amplificado (1x ganho. Adaptador ZCA-AMN16. Omnetics®. Tucker-Davis Technologies), que por sua vez era ligado a um cabo de registro (ZC16 - *headstage* digital ZIF-CLIP® de 16 canais ZC16 - Tucker-Davis Technologies). Os sinais foram filtrados entre 1 e 300 Hz, amplificados em 24.000 V/V e amostrados a aproximadamente 3 kHz por um bioamplificador (Tucker-Davis Technologies RZ2) (FIGURA 11C).

Os *timestamps* foram atrelados aos picos e vales da frequência de modulação do CS e foram registrados por uma porta de entrada digital do bioamplificador RZ2. Através de uma interpolação linear, esses valores temporais foram utilizados para obter uma série temporal instantânea de fase, que por sua vez foi utilizada para reconstruir o envelope de modulação do

CS (AMARAL-JÚNIOR and MOURÃO et al., 2019). Assim, a análise tempo-frequência poderia permanecer sincronizada com a apresentação do estímulo.

Os dados foram analisados *off-line* com códigos MATLAB personalizados e embutidos (MATLAB R2017a. EEGLab toolbox - <https://sccn.ucsd.edu/eeglab/index.php>). A potência de tempo-frequência dos SSEPs (faixa de $53,71 \pm 0,3$ Hz) foi calculada ao longo de cada apresentação pela função espectrograma padrão (transformada de Fourier de curta duração-STFT; janela Hamming de 32.768 pontos sem sobreposição, de 32.768 pontos) e normalizada pelos respectivos valores de linha de base (30 s antes do início do som).

Para calcular a fase Δ entre o envelope de modulação da amplitude de CS e as REARPs, os dados foram inicialmente filtrados na faixa de frequência de $53,71 \pm 2$ Hz e os coeficientes foram extraídos pela função padrão de Hilbert. A fase Δ foi calculada nas janelas de tempo médio de 3 s com sobreposição de 90% e definida como a diferença entre os componentes imaginários das REARPs e o envelope do CS:

$$Média \Delta fase = \frac{1}{N} arg \left[\sum_{n=1}^N e^{i(\phi_{REARP} - \phi_{CS})} \right]$$

Média Δ fase: argumento da soma dos vetores de fase, em que N é o número de amostras no eixo do tempo de cada sinal e ϕ_{SSEP} e ϕ_{CS} são os valores de fase para os envelopes SSEP e CS, respectivamente.

A coerência de fase entre o envelope do CS e as REARPs foi extraída por meio do comprimento do vetor médio das diferenças dos ângulos da fase:

$$Coerência de Fase = \frac{1}{N} \left| \sum_{n=1}^N e^{i(\phi_{REARP} - \phi_{CS})} \right|$$

Coerência de fase: métrica de sincronização de fase. Valor real adimensional entre 0, que representa uma distribuição de fase uniforme, e 1, um agrupamento de fases perfeito (LACHAUX et al., 1999; MORMANN et al., 2000).

4.7 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A aproximação da distribuição normal foi confirmada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($P > 0,05$). As comparações estatísticas foram feitas com análise de variância de medidas repetidas de uma ou duas vias (ANOVA), quando apropriado, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism 8.0a e MATLAB R2017a.

5. RESULTADOS

“Estarreci. A dor não pode mais do que a surpresa.”

(Riobaldo Tatarana)

5.1 Histologia e posicionamento dos eletrodos

Através das lesões eletrolíticas aplicadas antes da perfusão dos animais, observamos uma alta taxa de sucesso no posicionamento dos eletrodos no CIC (FIGURA 14A). O posicionamento foi confirmado também por análise das REARPs.

Os eletrodos da BLA tiveram maior variabilidade no alvo atingido. Baseado nas marcações eletrolíticas e traçados das cânulas, tivemos registros prevalentes na BA do lado esquerdo, com dois eletrodos no núcleo Ventro-Lateral da LA (LaVM) e um no núcleo Posterior da BLA (BLP). No lado direito, os alvos atingidos se distribuíram pela LaVM, BLP, BA núcleo ventral da BLA (BLV) (FIGURA 14B e C).

5.2 Comportamento

A BLA dos animais foi infundida, antes das sessões de teste, com solução salina ou muscimol, um agonista do receptor $GABA_A$. Independentemente da ordem do tratamento (muscimol ou salina primeiro), os animais exibiram uma resposta de congelamento robusta à apresentação do CS apenas quando a BLA foi tratada com salina ($F(2, 16) = 59,03$, $P < 0,0001$; **** $P < 0,0001$) (FIGURA 15B). Quando tratados com muscimol, os animais mantiveram os valores basais da sessão de pré-condicionamento ($P = 0,1417$). Além disso, avaliando separadamente cada apresentação do estímulo (FIGURA 15A), os animais apresentaram valores altos e constantes de congelamento (~ 80%) durante toda a sessão quando tratados com solução salina ($F(10, 80) = 14,89$, $P < 0,0001$), enquanto apenas a primeira apresentação do CS desencadeou uma resposta de congelamento significativa quando foram tratados com muscimol.

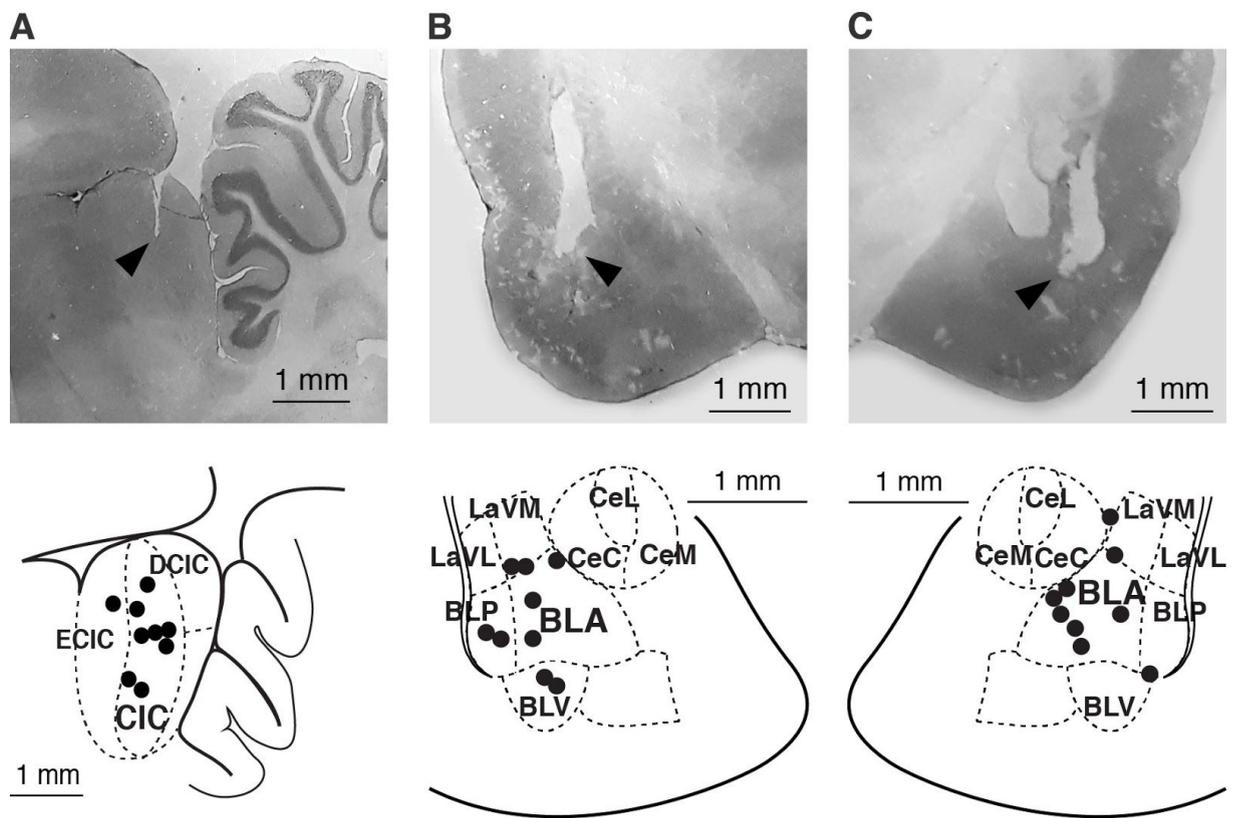


Figura 14 - Resultados histológicos. (A) Superior: fotomicrografia de uma lâmina com secção representativa do CI; cabeça de seta: lesão eletrolítica indicando a ponta do eletrodo. Inferior: desenho esquemático do CI com as posições das pontas dos eletrodos. (B) Superior: fotomicrografia de uma lâmina com secção representativa da BLA direita; cabeça de seta: lesões mecânica e eletrolítica indicando a posição do conjunto cânula-eletrodo. Inferior: desenho esquemático da BLA com as posições das pontas dos eletrodos. (C) Superior: fotomicrografia de uma lâmina com secção representativa da BLA direita; cabeça de seta: lesões mecânica e eletrolítica indicando a posição do conjunto cânula-eletrodo. Inferior: desenho esquemático da BLA com as posições das pontas dos eletrodos.

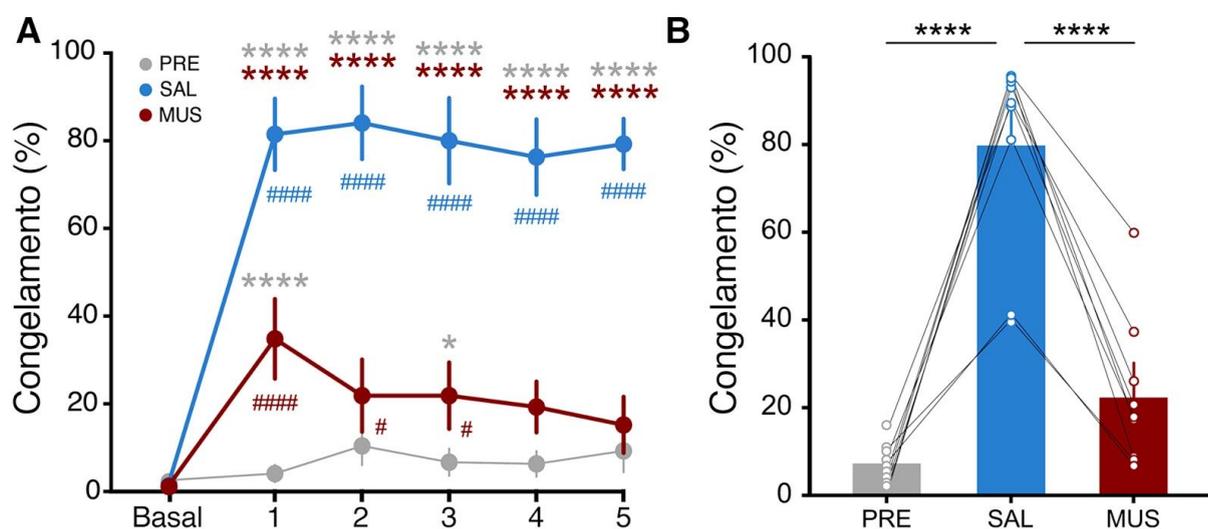


Figura 15 - Resultados comportamentais. (A) Média do congelamento (\pm EPM) ao longo de cada apresentação do CS nas sessões de pré-condicionamento e testes depois do tratamento com salina e muscimol (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. ANOVA de duas vias seguido de Teste de Tukey para múltiplas comparações). (B) Média total de congelamento (\pm EPM) nas sessões de pré-condicionamento e testes depois do tratamento com salina e muscimol (**** $P < 0.0001$. ANOVA de uma via seguido de Teste de Tukey para múltiplas comparações).

5.3 Registro eletrofisiológicos

A avaliação visual do traçado bruto dos registros no CI evidenciam um marcante aumento da amplitude do LFP durante a apresentação do estímulo estacionário em relação aos períodos silentes. A análise no domínio da frequência revela um aumento de energia concentrado especificamente em torno da frequência do envelope de modulação. A distribuição dos ângulos da fase relativa entre a as REARPs e a moduladora revela uma tendência de menor dispersão nos animais condicionados independente do tratamento.

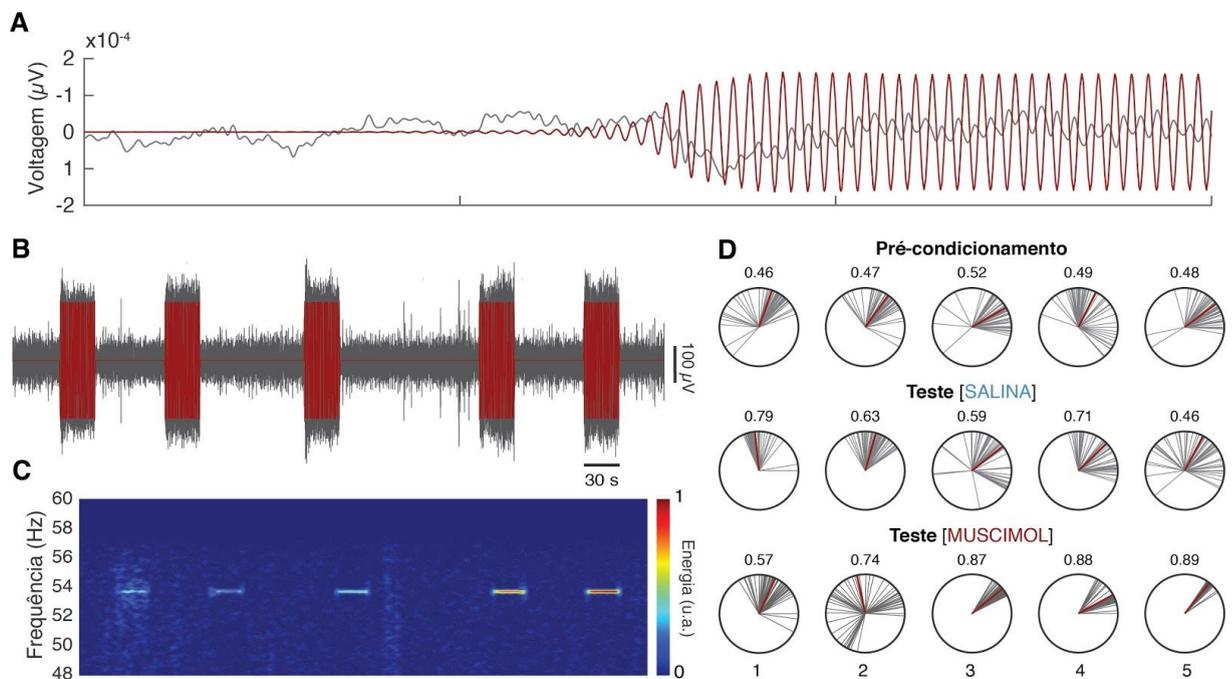


Figura 16 - Registros eletrofisiológicos de um animal representativo. (A) Esquema representativo do arrasto do envelope de modulação em 53,71 Hz na atividade evocada no CI. (B) Sinal representativo de um LFP filtrado em $53,71 \pm 2$ Hz (cinza) e apresentações do CS (vermelho, tons puros de 10 kHz modulados em amplitude a 53,71 Hz). (C) Espectrograma mostrando a energia das REARPs em 53,71 Hz. (u.a., unidades arbitrárias). (D) Vetores de variação de fase representativos em $53,71 \text{ Hz} \pm 3 \text{ Hz}$ (linhas cinzas) e respectivas estimativas de valores médios de fase (linhas vermelhas). Os números sobre os gráficos polares representam a coerência de cada apresentação do CS. Superior: sessão de pré-condicionamento. Meio: sessão de teste depois do tratamento com salina (0,9 % p/v). Inferior: sessão de teste depois de tratamento com muscimol (5 mg/mL).

5.4 Análise eletrofisiológica do Colículo Inferior

A atividade neural do CIC foi registrada durante as sessões de pré-condicionamento e teste do CACM. De acordo com os resultados, durante a apresentação dos estímulos, o CI mostrou uma assinatura espectral de potência induzida pelo CS (FIGURA 16C) com níveis consideráveis de sincronização entre seu envelope de modulação e a REARP (FIGURA 16A-D).

5.4.1 Parte I: Estímulo Condicionado (CS)

Durante a apresentação do CS, a energia média total das REARPs (FIGURA 17B, direita) foi maior em comparação às sessões de pré-condicionamento após o tratamento do BLA tanto com solução salina ($F(2, 22) = 1,30, P = 0,29; *P = 0,037$) quanto muscimol ($***P = 0,0003$). A mesma tendência foi observada na análise de cada apresentação, mas com diferença significativa apenas na segunda apresentação do CS (FIGURA 17A, inferior).

A análise quantitativa da coerência da fase encontrou resultados semelhantes. Durante a apresentação do CS, foram encontrados níveis significativamente mais altos de sincronização entre o envelope de modulação do CS e as REARPs em comparação às sessões de pré-condicionamento tanto após o tratamento com salina ($F(2, 22) = 5,28, P = 0,01; ***P = 0,0003$) como também (e principalmente) após o muscimol ($****P < 0,0001$) (FIGURA 17D, direita). Os valores médios totais das apresentações também foram significativamente maiores após os dois tratamentos se comparados à sessão de pré-condicionamento (FIGURA 17C, inferior). Vale ressaltar que o nível de significância foi ainda maior após o tratamento com muscimol do que com solução salina.

5.4.1 Parte II: Estímulo Neutro (NS)

Uma vez que os dados não corroboraram nossa hipótese, repetimos os experimentos com a reapresentação do som sob efeito do tratamento farmacológico a outro grupo de animais, mas desta vez sem a etapa de condicionamento, ou seja, utilizando o som como estímulo neutro (NS). Neste protocolo, os animais apresentaram maiores valores de energia em relação ao primeiro dia somente quando tratados com muscimol ($**P = 0,0025$), quando também apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento com salina ($**P = 0,0074$) (FIGURA 17B, esquerda).

O mesmo efeito foi observado para a coerência de fase, ou seja, os animais apresentaram altos níveis de sincronização apenas após o tratamento com muscimol ($F(2, 22) = 5,28, P = 0,01; ****P < 0,0001$), com diferenças significativas também entre os dois tratamentos ($***P = 0,0003$) (FIGURA 17D, esquerda).

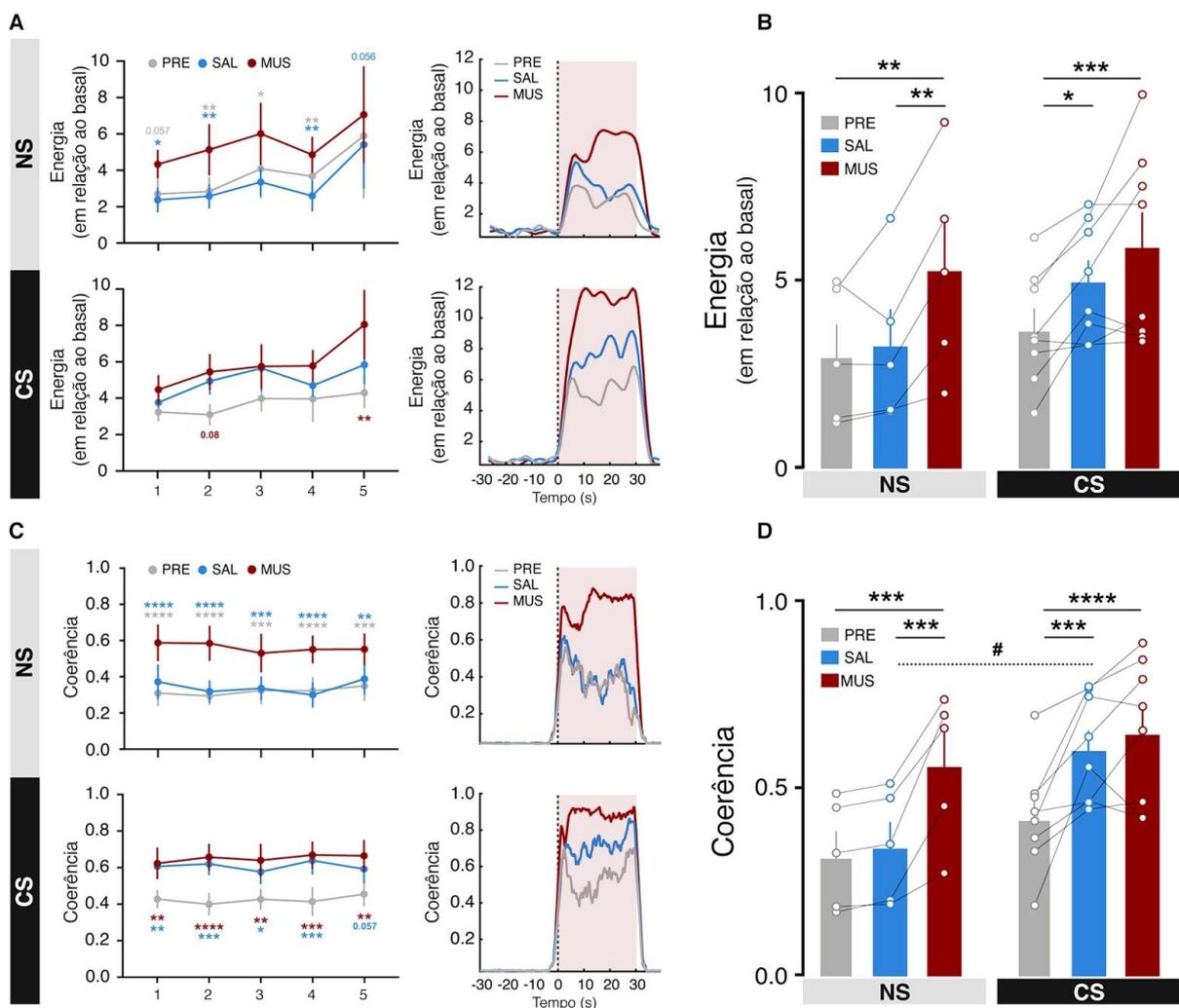


Figura 17 - Análises da atividade eletrofisiológicas no CI. (A) Superior esquerdo: energia média das REARPs em $53,7 \text{ Hz} \pm 2 \text{ Hz}$ ao longo das apresentações do NS (* $P < 0,05$). Superior direito: energia média em $53,7 \text{ Hz} \pm 2 \text{ Hz}$ ao longo do tempo antes do início do NS comparativamente aos 30 s de apresentação. Inferior esquerdo: energia média das REARPs em $53,7 \text{ Hz} \pm 2 \text{ Hz}$ ao longo das apresentações do CS (* $P < 0,05$). Inferior direito: energia média em $53,7 \text{ Hz} \pm 2 \text{ Hz}$ ao longo do tempo antes do início do CS comparativamente aos 30 s de apresentação. (B) Energia total média em $53,7 \text{ Hz} \pm 2 \text{ Hz}$ (\pm EPM) durante as apresentações do NS e do CS (* $P < 0,05$). (C) Superior esquerdo: média de coerência de fase em $53,7 \text{ Hz} \pm 3 \text{ Hz}$ ao longo das apresentações do NS. Superior direito: coerência de fase em $53,7 \text{ Hz} \pm 3 \text{ Hz}$ antes do início do NS comparativamente aos 30 s de sua apresentação. Inferior esquerdo: média da coerência de fase em $53,7 \text{ Hz} \pm 3 \text{ Hz}$ ao longo da apresentação do CS (* $P < 0,05$). Inferior direito: coerência de fase em $53,7 \text{ Hz} \pm 3 \text{ Hz}$ antes do início do CS comparativamente aos 30 s de sua apresentação. (D) Coerência de fase total média em $53,7 \text{ Hz} \pm 3 \text{ Hz}$ (\pm EPM) durante a apresentação do NS e do CS (* $P < 0,05$ and *** $P < 0,001$). (ANOVA de duas vias seguida e Teste de Tukey para comparações múltiplas em todas as comparações).

5.5 Análise eletrofisiológica da Amígdala Basolateral e de sua comunicação com o Colículo Inferior

Nove dos 10 animais condicionados foram excluídos das análises de registros eletrofisiológicos da BLA. Todos apresentaram algum tipo de prejuízo durante a aquisição do sinal que inviabilizou o uso dos dados para análise.

Alguns deles apresentaram, por exemplo, um alto índice de sincronia de fase na frequência da moduladora mesmo em períodos silentes, indicando um acoplamento claramente anormal entre os canais da amígdala e o som e/ou o canal do colículo (FIGURA 18A). A apresentação do som não afetou a variabilidade do ângulo da fase relativa entre a BLA e o CI, indicando que esse acoplamento realmente não tinha qualquer relação com a atividade evocada (FIGURA 18B). Diante dessas análises, mesmo eventuais indícios de atividade biologicamente gerada, como pequenas REARPs na BLA durante a apresentação do CS (FIGURA 18C) tiveram que ser ignoradas por não termos certeza de sua origem.

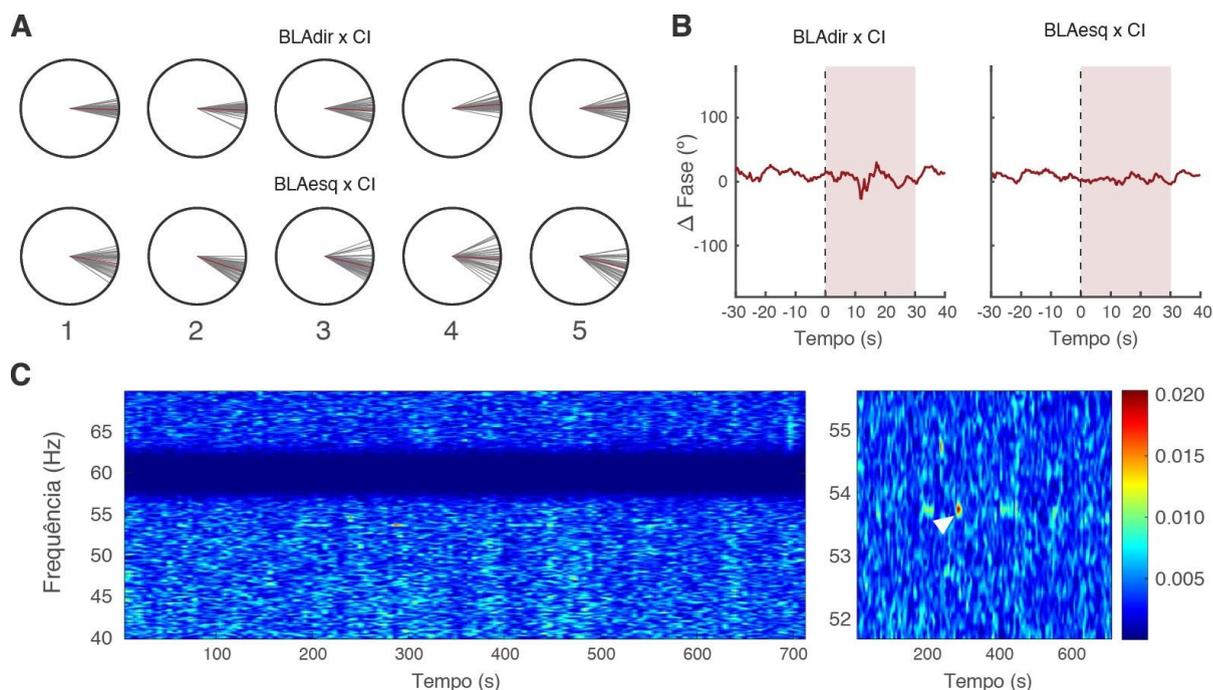


Figura 18 - Critérios de exclusão dos animais da análise de registros da BLA. (A) Gráficos polares representativos de alta coerência de fase durante período silente da sessão de

pré-condicionamento. (B) Apresentação do som não tem efeito na variabilidade da fase relativa entre CI e BLA. (C) Espectrograma sem REARPs.

Apenas um dos animais apresentou registros considerados confiáveis. Ao contrário das análises mostradas acima, ele apresentou uma dispersão de fase normal entre os canais da BLA e CI (FIGURA 19A) e a apresentação do som promoveu alterações no ângulo da fase relativa, indicando que o sinal registrado tem um componente biológico ativo (FIGURA 19B). Não foram observadas REARPs em nenhuma das duas condições experimentais (FIGURA 19C).

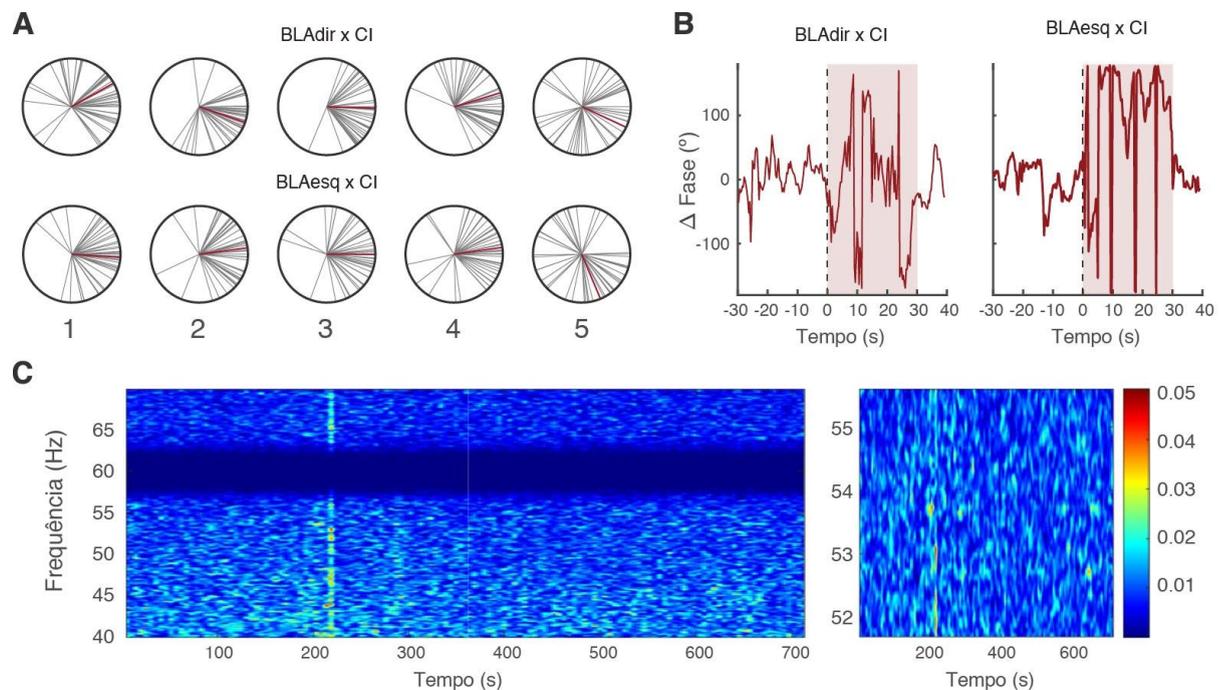


Figura 19 - Critérios de inclusão de um animal na análise qualitativa de registros da BLA. (A) Gráficos polares representativos de alta dispersão de fase durante período silente da sessão de pré-condicionamento. (B) Apresentação do som afeta a variabilidade da fase relativa entre CI e BLA. (C) Espectrograma sem REARPs.

A preservação do sinal da BLA neste animal foi também corroborada por um aumento da energia na banda teta durante a reapresentação do CS, em relação à sessão pré-condicionamento, quando tratado com salina, conforme inspeção visual do espectrograma (FIGURA 20B, inferior). O tratamento com muscimol, como esperado, parece ter causado um rebaixamento geral da atividade em todas as frequências (FIGURA 20C, inferior).

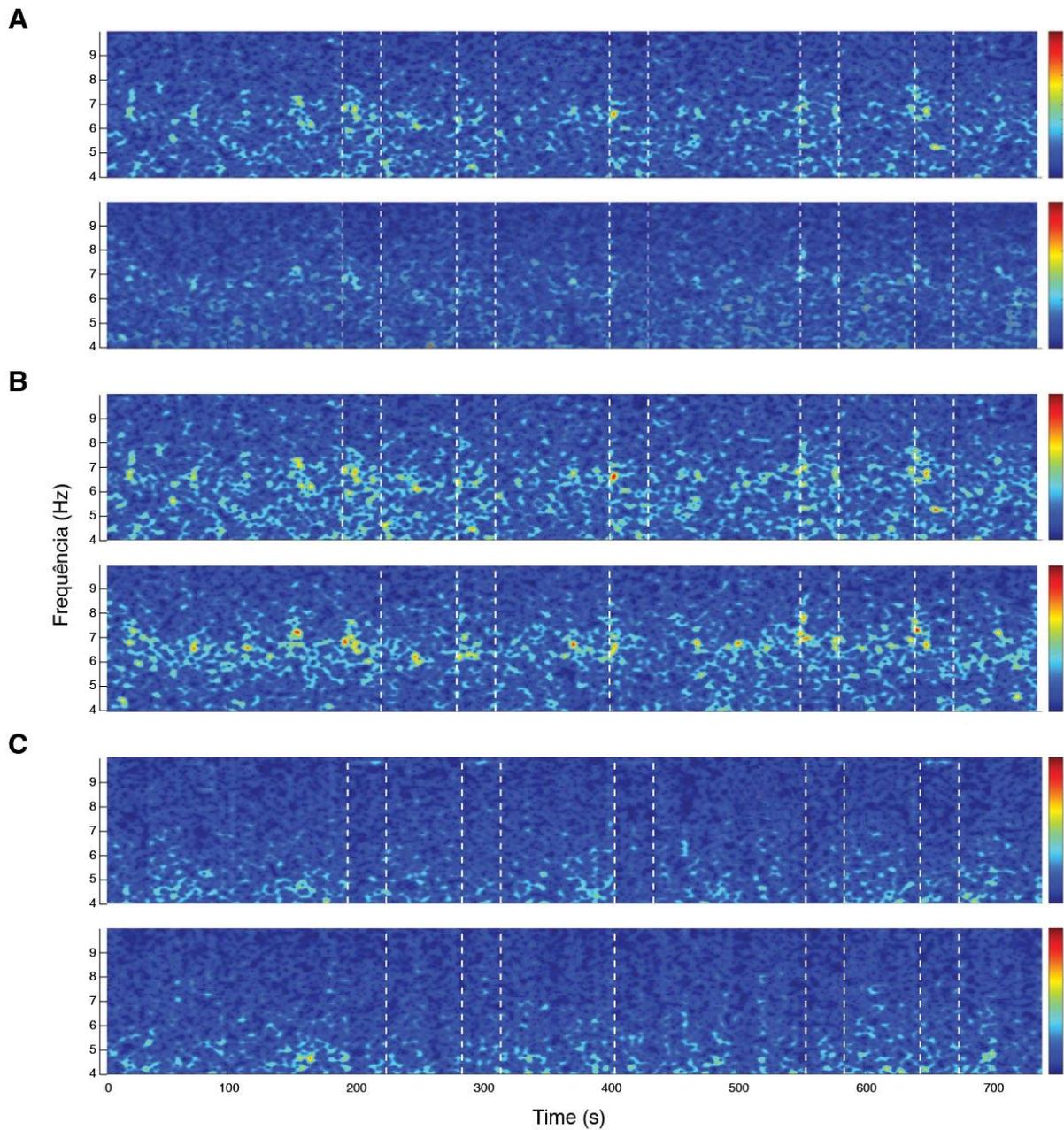


Figura 20 - Espectrograma para avaliação qualitativa da atividade na banda teta (4-10Hz) na BLA de um animal. (A) Sessão pré-condicionamento. Superior: CI. Inferior: BLA. (B) Sessão de teste com injeção de salina. Superior: CI. Inferior: BLA. (C) Sessão de teste com injeção de muscimol. Superior: CI. Inferior: BLA

Ainda a partir de uma inspeção visual de espectrogramas, comparando a atividade em teta nos canais da BLA e CI, é possível notar alguns pontos que poderiam indicar potenciais acoplamentos nessa faixa de frequência (FIGURA 21, cabeças de seta pretas). No entanto, a presença de *clusters* de alta intensidade espectral temporalmente coincidentes deixam mesmo esses registros sob suspeita.

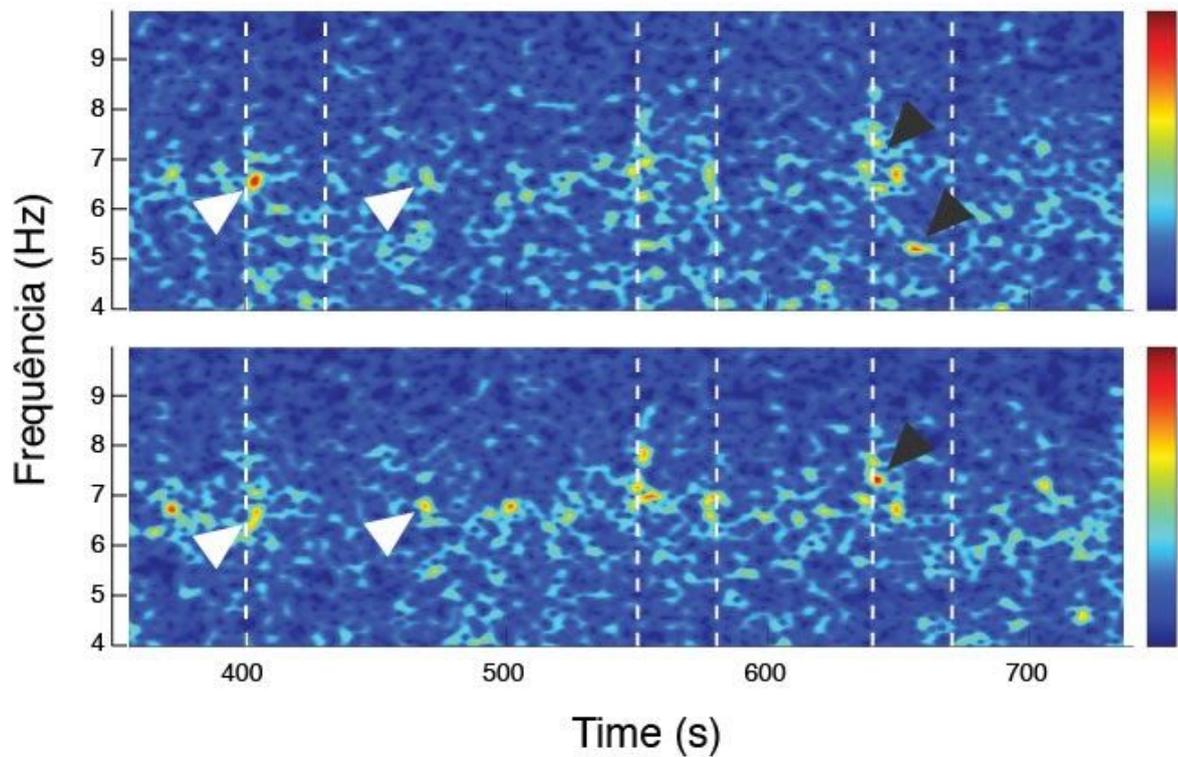


Figura 21 - Aumento da atividade em teta na BLA e no CI. Superior: CI. Inferior: BLA. Cabeças de seta brancas: *clusters* de atividade espectral idêntica sugerindo interferência. Cabeças de seta pretas: *clusters* de atividade espectral aparentemente sem interferência.

6. DISCUSSÃO

“O senhor espere o meu contato. Não convém a gente levantar escândalo de começo, só aos poucos é que o escuro é claro.”

(Riobaldo Tatarana)

6.1 Resultados do Colículo Inferior

Nossos resultados corroboram o fato de que a inibição da BLA prejudica a expressão do comportamento de congelamento em tarefas de condicionamento do medo (HELMSTETTER; BELLGOWAN, 1994). Também reproduzimos o resultado anterior de que o CACM aumenta sincronia de fase relativa e energia das REARPs induzidas pelo envelope do CS no CI (LOCKMANN; MOURÃO; MORAES, 2017).

Surpreendentemente, entretanto, nossos dados revelaram que a inibição da BLA com muscimol, apesar de diminuir a expressão do congelamento, aumentou as REARPs no CI comparativamente à sessão de pré-condicionamento, representando uma contradição entre o comportamento condicionado prejudicado e um aumento da atividade evocada pelo CS. Executando a mesma análise com as respostas evocadas a partir de um estímulo neutro (NS), mostramos que esse aumento é um resultado da inibição da BLA que independe da realização da tarefa de condicionamento. Uma vez silenciada a BLA, qualquer estímulo auditivo, condicionado ou não, evocará resposta de grande amplitude e alta sincronia de fase com o envelope de modulação do estímulo. Além disso, pelo menos neste caso o aumento desses parâmetros não estava correlacionado com a expressão do comportamento adaptativo e nem era condição suficiente para que ele ocorresse, sugerindo que as projeções da BLA para a CeM e para o CI divergem em algum ponto do circuito intrínseco do complexo amigdalóide.

A ativação de receptores GABAérgicos na BLA, como induzida no presente trabalho através da microinjeção de muscimol, inibe a atividade dos neurônios glutamatérgicos da BA para a CeA sendo suficiente para comprometer a expressão do comportamento de congelamento (DUVARCI; PARE, 2014), o que explica o prejuízo da resposta condicionada nos animais tratados com a droga.

O efeito da injeção de muscimol na BLA sobre a atividade do CI já foi avaliado anteriormente, mas em uma tarefa contextual em que o efeito na amplitude das respostas evocadas no CI variou de acordo com o nível de ansiedade dos animais (NOBRE; BRANDÃO, 2011). As mudanças consistentes nos REARPs do CI após o CACM (LOCKMANN; MOURÃO; MORAES, 2017) se mostraram um paradigma muito mais promissor. De acordo com nossos resultados, a BLA não promove essas alterações pela atividade direta de neurônios glutamatérgicos de saída, mas provavelmente pela mediação de circuitos inibitórios.

Uma possível explicação para o mecanismo subjacente é que a BLA exerce um controle inibitório tônico sobre o CI (BRANDÃO et al., 2005) e a inibição local da primeira estrutura promoveria uma resultante de desinibição indireta na segunda. O efeito local da injeção de muscimol na BLA é a hiperpolarização de neurônios que apresentam receptores GABA_A, que incluem interneurônios PV⁺ mas principalmente neurônios glutamatérgicos de saída (DUVARCI; PARE, 2014; EHRLICH et al., 2009). Entre eles estão os neurônios piramidais magnocelulares da porção anterior da BLA, que respondem a estímulos aversivos (KIM et al., 2016) e formam uma projeção direta no CI, incluindo seu núcleo central (MARSH et al., 2002). Há uma alta densidade de neurônios GABAérgicos no CI (EDGAR; SCHWARTZ, 1990; FUBARA et al., 1996) e um de seus subtipos, os grandes neurônios GABAérgicos, exibe sinapses glutamatérgicas axossomáticas que são mais prevalentes no núcleo central (ITO; BISHOP; OLIVER, 2009). Seguindo essa lógica, a hiperpolarização de neurônios piramidais glutamatérgicos na BLA promoveria uma diminuição na ativação desses grandes interneurônios no CI, permitindo um aumento da atividade evocada por estímulos sensoriais nessa estrutura. O bloqueio de receptores GABA_A no CI simularia o mesmo efeito da desativação desses neurônios e de fato foi demonstrado que essa manipulação aumenta a taxa de disparo dos neurônios excitatórios do CI em resposta ao estímulo auditivo (PÉREZ-GONZÁLEZ et al., 2012).

É necessária uma investigação mais aprofundada para que esse mecanismo presumido se mostre verdadeiro. Porém, como o arrasto da atividade do CI pelo estímulo auditivo após o condicionamento ao medo é semelhante ao efeito do tratamento da BLA com muscimol, independentemente da tarefa associativa, pode-se hipotetizar que a inibição dos neurônios

glutamatérgicos piramidais em sua porção anterior é a maneira pela qual a BLA modula a atividade do CI após o condicionamento. Essa hipótese poderia ser explicada pela existência de neurônios inibitórios entre as projeções aferentes da LA e os neurônios glutamatérgicos da porção anterior da BA que projetam para o CI. Esses interneurônios representariam uma divergência entre os circuitos que deflagram o comportamento de medo e os que modulam a via sensorial no CI (FIGURA 22).

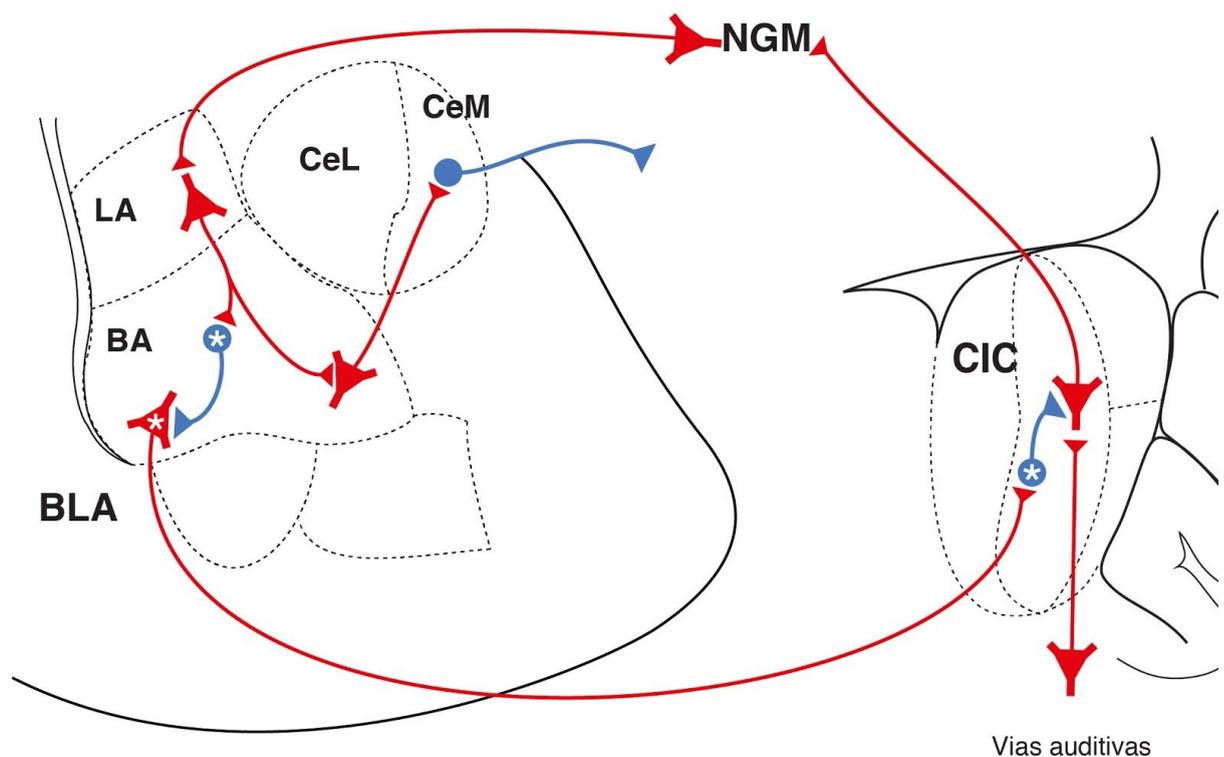


Figura 22 - Circuito amígdalo-colicular proposto por este trabalho. A organização funcional das células marcadas com um asterisco é hipotética e proposta a partir dos resultados deste trabalho. Neurônios excitatórios em vermelho. Neurônios inibitórios em azul.

Se essa hipótese for verdadeira, a BLA retiraria seletivamente seu tônus inibitório quando um estímulo relevante fosse detectado, permitindo uma transmissão aprimorada do sinal sonoro relevante ao longo da via auditiva e funcionando como uma espécie de filtro de passagem de relevância.

6.2 Resultados da Amígdala Basolateral

Infelizmente, aquele que seria o grande diferencial deste trabalho não pode ser realizado. Esta é, sem dúvida, a grande frustração de todos esses anos de trabalho. É preciso reconhecer com pesar que nossos esforços, embora intensos, não foram suficientes para vencer os desafios desta etapa do projeto. Testamos, por exemplo, vários arranjos cânula-eletrodo diferentes, mas nem o mais promissor deles, pelo menos durante os experimentos piloto, logrou o sucesso que esperávamos.

A seguir, elencamos erros recorrentes que podem ter contribuído para o insucesso dos registros.

1. Anatômicos:
 - a. Erro no posicionamento das coordenadas nos eixos AP e ML e descida no eixo DV;
 - b. Desvio na angulação ortogonal de inserção do arranjo cânula-eletrodo;
 - c. Desvio na ponta do eletrodo em contato com o tecido durante a descida, muito embora o arranjo com o eletrodo passando por dentro da cânula tenha sido concebido para minimizar esse erro.
2. De manipulação:
 - a. Erro na solda dos eletrodos nos contatos dos terminais RJ-12, embora fossem previamente testados para presença de curto circuitos entre eles;
 - b. Vazamento líquido para dentro do RJ-12, gerando ponte salina entre os canais;
 - c. Rompimento do teflon de isolamento dos fios do eletrodo na dobra de fixação junto à borda da cânula, gerando contato entre ambos, embora essa possibilidade também fosse testada antes da cirurgia.

- d. Rompimento do teflon pela agulha de injeção durante esse procedimento, prejudicando o isolamento do fio.

Apesar de tudo, tivemos pelo menos um animal com registros aparentemente confiáveis e conseguimos observar a atividade na banda de frequência esperada. O protocolo como um todo, portanto, foi bem sucedido e o que nos separa de uma adequada investigação do fenômeno são questões técnica contornáveis com testes melhor controlados no futuro.

6.3 Mecanismo propostos

O insucesso com os registros da BLA nos privou de dados confiáveis que nos permitissem cumprir um dos objetivos deste trabalho que era avaliar a comunicação entre esse núcleo e o CI durante a exposição a um estímulo aversivo condicionado numa tarefa de memória associativa.

Por outro lado, os dados analisados permitiram conjecturar a existência de um circuito amígdalo-colicular modulado por interneurônios GABAérgicos da BA que atuaria na regulação do sinal sensorial de entrada da via auditiva. no CI após uma tarefa de condicionamento aversivo.

Durante a apresentação do CS sob efeito da microinjeção local de salina na BLA, os neurônios glutamatérgicos da LA, carreando a informação já potenciada do estímulo auditivo, ativariam neurônios excitatórios de projeção para a CeM favorecendo a expressão do comportamento de congelamento, como já se sabe (DUVARCI; PARE, 2014). Com base em nossos dados, sugerimos que os neurônios da LA ativam paralelamente interneurônios inibitórios que, por sua vez, inibem os neurônios de projeção para o CI. Desta forma, as terminações glutamatérgicas amígdalo-coliculares não ativarão os grandes neurônios GABAérgicos do núcleo central do CI, retirando o tônus GABAérgico e favorecendo uma resposta evocada aumentada na via auditiva (FIGURA 23).

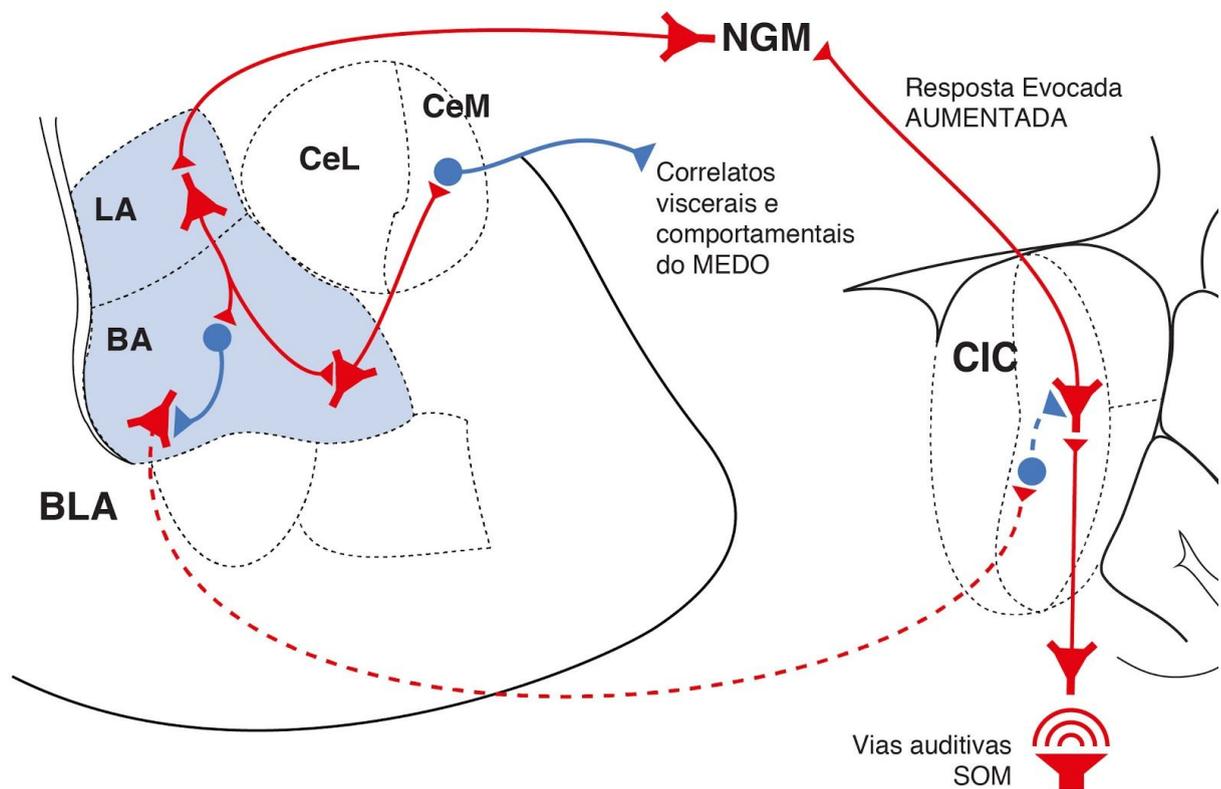


Figura 23 - Mecanismo do hipotético circuito amígdalo-colicular durante apresentação do CS sob efeito da injeção de salina. Neurônios principais da LA ativam neurônios glutamatérgicos da BA que ativam neurônios GABAérgicos na CeA, promovendo o congelamento. Paralelamente, os neurônios principais da LA ativam interneurônios na BA que inibem as projeções amígdalo-coliculares. Interneurônios no CIC não são ativados e permitem a passagem de uma REARP aumentada. Neurônios excitatórios em vermelho. Neurônios inibitórios em azul.

A microinjeção de muscimol na BLA, por outro lado, gera um tônus inibitório local através da ativação de receptores $GABA_A$. Todas as células que expressam esses receptores terão baixíssima probabilidade de disparo graças ao constante influxo de íons cloro. Desta maneira, os neurônios glutamatérgicos da BA que projetam tanto para a CeA quanto para o CI estarão inibidos. A consequência da não ativação da primeira estrutura será um prejuízo na expressão do comportamento de congelamento. No entanto, o efeito decorrente da inibição da projeção para o CI será semelhante ao da ativação normal desse circuito durante a apresentação do CS, já que o agonismo GABAérgico promovido pelo muscimol emula o

efeito da ativação dos interneurônios que hipoteticamente modulam sua atividade (FIGURA 24).

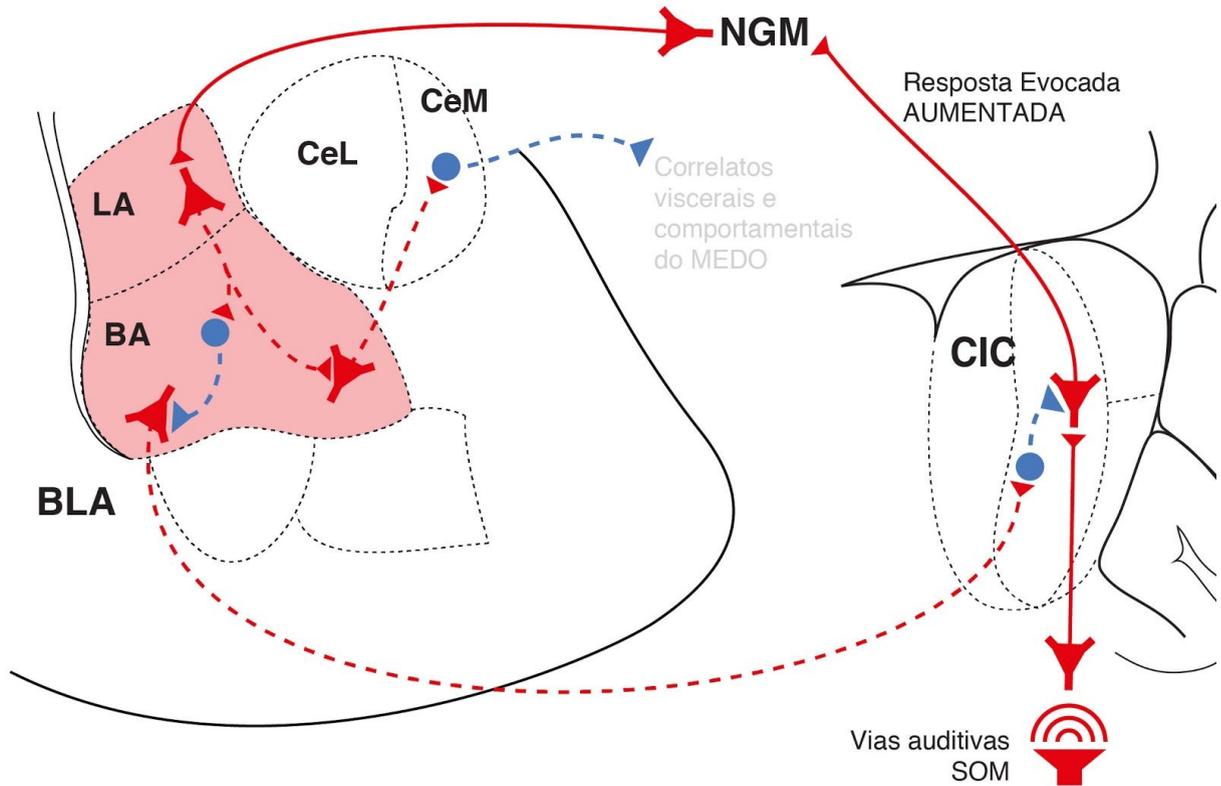


Figura 24 - Mecanismo do hipotético circuito amígdalo-colicular durante apresentação do CS sob efeito da injeção de muscimol. Neurônios principais da LA e BA são inibidos pela ação do muscimol. Neurônios GABAérgicos na CeA não são ativados e prejudicam a expressão do congelamento. Paralelamente, as projeções amígdalo-coliculares são diretamente inibidas pelo muscimol, interneurônios no CIC não são ativados e permitem a passagem de uma REARP aumentada. Neurônios excitatórios em vermelho. Neurônios inibitórios em azul.

Na ausência de relevância emocional associada à informação auditiva, os neurônios da LA não estão potenciados e portanto não respondem com a mesma intensidade ao estímulo neutro (NS). Nessa situação, as projeções excitatórias intrínsecas da LA para a BA não são ativadas e, portanto, também não o são os interneurônios inibitórios que regulam a atividade dos neurônios glutamatérgicos da porção anterior da BA. Eles, portanto, permanecem ativos provocam a ativação em cascata de neurônios GABAérgicos no núcleo central do CI. Esses neurônios mantêm um tônus inibitório que cria uma barreira eletrotônica que atenua a

propagação de informação não relevante ao longo da via. Esse mecanismo só será desligado através da modulação top-down da amígdala ao reconhecer uma informação auditiva relevante, gerando uma facilitação da transmissão desse sinal para vias superiores, funcionando como uma espécie de filtro seletivo de relevância.

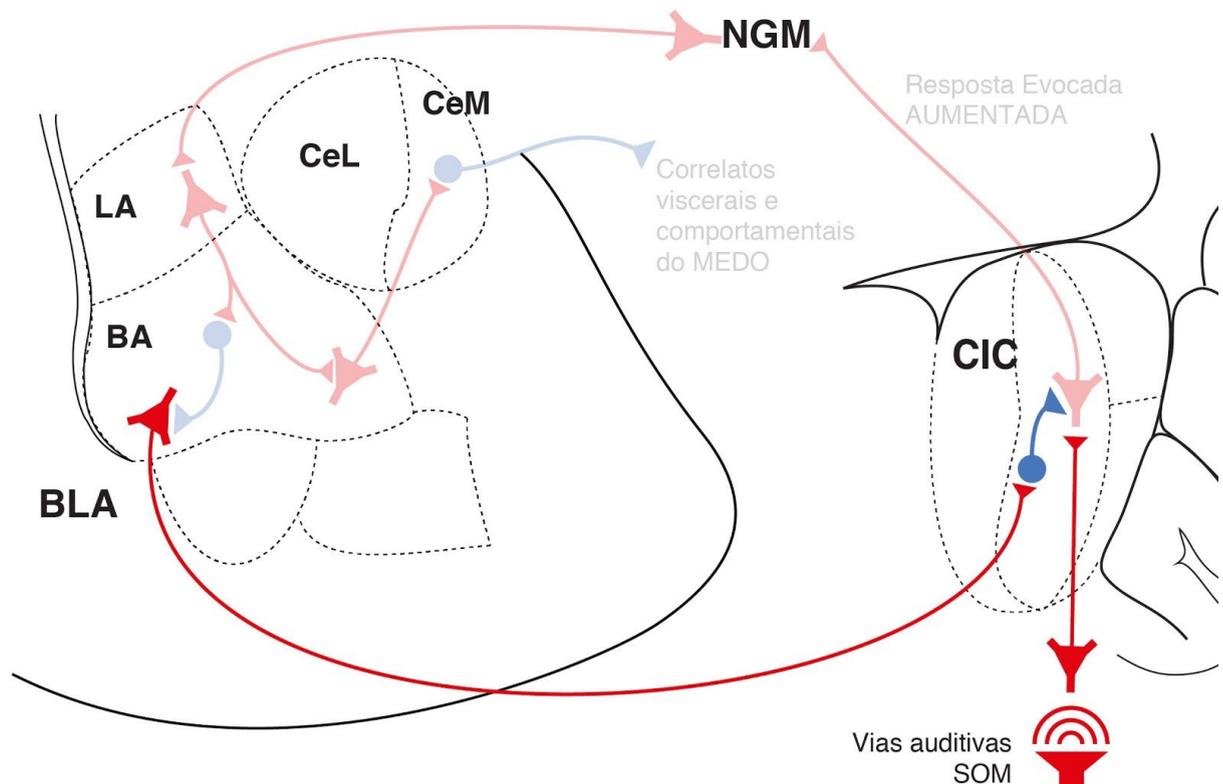


Figura 25 - Mecanismo do hipotético circuito amígdalo-colicular durante apresentação do NS. Neurônios principais da LA não ativam os interneurônios da BA, que por sua vez não inibem as projeções amígdalo-coliculares, que permanecem ativas. Elas ativam os interneurônios no CIC que mantêm uma inibição tônica nesta estrutura, atenuando o sinal não relevante ao longo da via auditiva.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

“Nonada. O diabo não há! É o que eu digo, se for... Existe é homem humano. Travessia.”

(Riobaldo Tatarana)

Erros e acertos fazem parte da construção do conhecimento. Os operários da ciência que atuam ou atuaram diariamente na bancada haverão de concordar que essa mistura tem mais doses proporcionais dos primeiros que dos segundos. Este trabalho resultou, curiosamente, em dois tipos de eventos raramente admitidos na publicação científica: o ajuste de uma hipótese não confirmada e um erro técnico. Se é verdade que os equívocos estão no alicerce da construção do saber, o edifício que aqui se inaugura tem boas chances de não vergar.

Para além dos resultados obtidos, analisados e discutidos nas seções anteriores, temos de positivo a consolidação de uma linha de pesquisa com o uso das REARPs em paradigmas de tarefas cognitivas em nosso laboratório com a sequência do trabalho que inaugurou essa linha no NNC (LOCKMANN; MOURÃO; MORAES, 2017). A confirmação do envolvimento da amígdala no fenômeno observado inicialmente abre a perspectiva de uma rica linha de pesquisa a partir dessa ferramenta. Esta linha já está sendo explorada e resultados preliminares promissores em camundongos já envolvem registros bem sucedidos na BLA, CI e mPFC, ampliando a circuitaria envolvida nas modulações *bottom-up* e *top-down* do comportamento aprendido de medo.

Do ponto de vista técnico, sabemos que microinjeções farmacológicas são uma técnica relativamente suja, sobretudo quando as estruturas alvo são muito pequenas e morfológicamente diversas, como o complexo amigdalóide. Esta teria sido uma limitação intrínseca à análise de dados da atividade da amígdala caso tivesse sido bem sucedida. É por isso também que, apesar de termos tido como alvo anatômico a BA, por seu caráter de integração sensório-motora e expressão comportamental, em nenhum momento assumimos que os efeitos observados estariam restritos a ela, tendo o cuidado de nos referirmos sempre à BLA como estrutura avaliada.

Os caminhos estão postos. E o que eles querem da gente é coragem.

8. REFERÊNCIAS

- ALCOCK, J. **Comportamento Animal: Uma Abordagem Evolutiva**. [s.l.] Artmed Editora, 2016.
- AMARAL-JÚNIOR, P. A. and MOURÃO et al. A Custom Microcontrolled and Wireless-Operated Chamber for Auditory Fear Conditioning. **Frontiers in neuroscience**, v. 13, p. 1193, 7 nov. 2019.
- ARIKAN, R. et al. A method to measure the effective spread of focally injected muscimol into the central nervous system with electrophysiology and light microscopy. **Journal of neuroscience methods**, v. 118, n. 1, p. 51–57, 30 jul. 2002.
- BAJO, V. M. et al. The descending corticocollicular pathway mediates learning-induced auditory plasticity. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 2, p. 253–260, fev. 2010.
- BAJO, V. M.; KING, A. J. Cortical modulation of auditory processing in the midbrain. **Frontiers in neural circuits**, v. 6, p. 114, jan. 2012.
- BARCZAK, A. et al. Top-down, contextual entrainment of neuronal oscillations in the auditory thalamocortical circuit. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 32, p. E7605–E7614, ago. 2018.
- BAR, M. The proactive brain: memory for predictions. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1521, p. 1235–1243, maio 2009.
- BENSMAIA, S. J. et al. The representation of stimulus orientation in the early stages of somatosensory processing. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 3, p. 776–786, 16 jan. 2008.
- BIACABE, B. et al. Functional anatomy of auditory brainstem nuclei: application to the anatomical basis of brainstem auditory evoked potentials. **Auris, nasus, larynx**, v. 28, n. 1, p. 85–94, jan. 2001.
- BIRT, D.; NIENHUIS, R.; OLDS, M. Separation of associative from non-associative short latency changes in medial geniculate and inferior colliculus during differential conditioning and reversal in rats. **Brain research**, v. 167, n. 1, p. 129–138, maio 1979.
- BORDI, F.; LEDOUX, J. Sensory tuning beyond the sensory system: an initial analysis of auditory response properties of neurons in the lateral amygdaloid nucleus and overlying areas of the striatum. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 2493–2503, jul. 1992.
- BOSNYAK, D. J.; EATON, R. A.; ROBERTS, L. E. Distributed auditory cortical representations are modified when non-musicians are trained at pitch discrimination with 40 Hz amplitude modulated tones. **Cerebral cortex**, v. 14, n. 10, p. 1088–1099, out. 2004.
- BRANDÃO, M. L. et al. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the

midbrain tectum. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 29, n. 8, p. 1299–1311, 9 ago. 2005.

BROWN, R. J.; NORCIA, A. M. A method for investigating binocular rivalry in real-time with the steady-state VEP. **Vision research**, v. 37, n. 17, p. 2401–2408, set. 1997.

BUZSAKI, G. **Rhythms of the Brain**. [s.l.] Oxford University Press, USA, 2006.

BUZSÁKI, G.; ANASTASSIOU, C. A.; KOCH, C. The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 13, p. 407, 2012.

CHAREYRON, L. J. et al. Stereological analysis of the rat and monkey amygdala. **The Journal of comparative neurology**, v. 519, n. 16, p. 3218–3239, 1 nov. 2011.

CIOCCHI, S. et al. Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 277–282, nov. 2010.

CLOPTON, B. M.; WINFIELD, J. A. Tonotopic organization in the inferior colliculus of the rat. **Brain research**, v. 56, p. 355–358, 29 jun. 1973.

CURZON, P.; RUSTAY, N. R.; BROWMAN, K. E. Cued and contextual fear conditioning for rodents. In: **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. 2nd edition**. [s.l.] CRC Press/Taylor & Francis, 2009.

DAMÁSIO, A. **O erro de Descartes: Emoção, razão e o cérebro humano**. [s.l.] Companhia das Letras, 19 de novembro de 2012.

DAVIS, P. et al. Cellular and oscillatory substrates of fear extinction learning. **Nature neuroscience**, v. 20, n. 11, p. 1624–1633, nov. 2017.

DISTERHOFT, J. F.; STUART, D. K. Differentiated short latency response increases after conditioning in inferior colliculus neurons of alert rat. **Brain research**, v. 130, n. 2, p. 315–333, jul. 1977.

DUVARCI, S.; PARE, D. Amygdala Microcircuits Controlling Learned Fear. **Neuron**, v. 82, n. 5, p. 966–980, jun. 2014.

EDGAR, P. P.; SCHWARTZ, R. D. Localization and characterization of 35S-t-butylbicyclophosphorothionate binding in rat brain: an autoradiographic study. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 10, n. 2, p. 603–612, fev. 1990.

EHRlich, I. et al. Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. **Neuron**, v. 62, n. 6, p. 757–771, 25 jun. 2009.

ENGEL, A. K.; FRIES, P.; SINGER, W. Dynamic predictions: Oscillations and synchrony in top–down processing. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 10, p. 704–716, out. 2001.

FANSELOW, M. S.; KIM, J. J. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric

acid to the basolateral amygdala. **Behavioral neuroscience**, v. 108, n. 1, p. 210–212, fev. 1994.

FANSELOW, M. S.; PENNINGTON, Z. T. The Danger of LeDoux and Pine's Two-System Framework for Fear. **American Journal of Psychiatry**, v. 174, n. 11, p. 1120–1121, 1 nov. 2017.

FELL, J.; AXMACHER, N. The role of phase synchronization in memory processes. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 105–118, fev. 2011.

FONTANINI, A.; KATZ, D. B. Behavioral states, network states, and sensory response variability. **Journal of neurophysiology**, v. 100, n. 3, p. 1160–1168, set. 2008.

FREESE, J. L.; AMARAL, D. G. The organization of projections from the amygdala to visual cortical areas TE and V1 in the macaque monkey. **The Journal of comparative neurology**, v. 486, n. 4, p. 295–317, 13 jun. 2005.

FUBARA, B. M. et al. Distribution of GABAA, GABAB, and glycine receptors in the central auditory system of the big brown bat, *Eptesicus fuscus*. **The Journal of comparative neurology**, v. 369, n. 1, p. 83–92, 20 maio 1996.

FUJIKI, N.; JOUSMÄKI, V.; HARI, R. **Fujiki et al 2002 J Neurosci.pdf**. [s.l: s.n.].

GALAMBOS, R.; MAKEIG, S.; TALMACHOFF, P. J. A 40-Hz auditory potential recorded from the human scalp. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 4, p. 2643–2647, abr. 1981.

GANDER, P. E.; BOSNYAK, D. J.; ROBERTS, L. E. Acoustic experience but not attention modifies neural population phase expressed in human primary auditory cortex. **Hearing research**, v. 269, n. 1-2, p. 81–94, 1 out. 2010.

GILBERT, C. D.; SIGMAN, M. Brain States: Top-Down Influences in Sensory Processing. **Neuron**, v. 54, n. 5, p. 677–696, jun. 2007.

GONZALEZ-LIMA, F.; AGUDO, J. Functional reorganization of neural auditory maps by differential learning. **Neuroreport**, v. 1, n. 2, p. 161–164, out. 1990.

GOOSENS, K. A.; MAREN, S. Pretraining NMDA receptor blockade in the basolateral complex, but not the central nucleus, of the amygdala prevents savings of conditional fear. **Behavioral neuroscience**, v. 117, n. 4, p. 738–750, ago. 2003.

GROSSBERG, S. How does a brain build a cognitive code? **Psychological review**, v. 87, n. 1, p. 1–51, jan. 1980.

HEBB, D. O. **The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory**. [s.l: s.n.].

HELMSTETTER, F. J.; BELLGOWAN, P. S. Effects of muscimol applied to the basolateral amygdala on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. **Behavioral neuroscience**, v. 108, n. 5, p. 1005–1009, out. 1994.

HOPKINS, D. A.; HOLSTEGE, G. Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat. **Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale**, v. 32, n. 4, p. 529–547, 15 ago. 1978.

HUANG, C. M.; FEX, J. Tonotopic organization in the inferior colliculus of the rat demonstrated with the 2-deoxyglucose method. **Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale**, v. 61, n. 3, p. 506–512, 1986.

ITO, T.; BISHOP, D. C.; OLIVER, D. L. Two classes of GABAergic neurons in the inferior colliculus. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 44, p. 13860–13869, 4 nov. 2009.

JANAK, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 284–292, 15 jan. 2015.

JI, W.; SUGA, N. Tone-specific and nonspecific plasticity of inferior colliculus elicited by pseudo-conditioning: role of acetylcholine and auditory and somatosensory cortices. **Journal of neurophysiology**, v. 102, n. 2, p. 941–952, ago. 2009.

JOHANSEN, J. P. et al. Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 28, p. 12692–12697, 13 jul. 2010.

KALITZIN, S. et al. Enhancement of phase clustering in the EEG/MEG gamma frequency band anticipates transitions to paroxysmal epileptiform activity in epileptic patients with known visual sensitivity. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 49, n. 11, p. 1279–1286, nov. 2002.

KARALIS, N. et al. 4-Hz oscillations synchronize prefrontal-amygdala circuits during fear behavior. **Nature neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 605–612, abr. 2016.

KIM, J. et al. Antagonistic negative and positive neurons of the basolateral amygdala. **Nature neuroscience**, v. 19, n. 12, p. 1636–1646, dez. 2016.

KUWADA, S. et al. Sources of the scalp-recorded amplitude-modulation following response. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 13, n. 4, p. 188–204, abr. 2002.

KVERAGA, K.; GHUMAN, A. S.; BAR, M. Top-down predictions in the cognitive brain. **Brain and cognition**, v. 65, n. 2, p. 145–168, nov. 2007.

LACHAUX, J.-P. et al. **Measuring phase synchrony in brain signals** *Human Brain Mapping*, 1999. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0193\(1999\)8:4<194::aid-hbm4>3.0.co;2-c](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-0193(1999)8:4<194::aid-hbm4>3.0.co;2-c)

LEDOUX, J.; DAW, N. D. Surviving threats: neural circuit and computational implications of a new taxonomy of defensive behaviour. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 19, n. 5, p. 269–282, maio 2018.

LEDOUX, J. E. Coming to terms with fear. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences of the United States of America, v. 111, n. 8, p. 2871–2878, 25 fev. 2014.

LEDOUX, J. E.; FARB, C. R.; ROMANSKI, L. M. Overlapping projections to the amygdala and striatum from auditory processing areas of the thalamus and cortex. **Neuroscience letters**, v. 134, n. 1, p. 139–144, 16 dez. 1991.

LEDOUX, J. E.; FARB, C.; RUGGIERO, D. A. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 1043–1054, abr. 1990.

LEDOUX, J. E.; PINE, D. S. Using Neuroscience to Help Understand Fear and Anxiety: A Two-System Framework. **The American journal of psychiatry**, v. 173, n. 11, p. 1083–1093, 1 nov. 2016.

LEDOUX, J. E.; SAKAGUCHI, A.; REIS, D. J. Subcortical efferent projections of the medial geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 683–698, mar. 1984.

LEDOUX, J.; PHELPS, L.; ALBERINI, C. What we talk about when we talk about emotions. **Cell**, v. 167, p. 1443–1445, 2016.

LEE, H. J. et al. Amygdalar nmda receptors are critical for the expression of multiple conditioned fear responses. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 11, p. 4116–4124, 1 jun. 2001.

LESTING, J. et al. Directional theta coherence in prefrontal cortical to amygdalo-hippocampal pathways signals fear extinction. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e77707, 24 out. 2013.

LIKHTIK, E. et al. Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. **Nature neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 106–113, jan. 2014.

LOCKMANN, A. L. V.; MOURÃO, F. A. G.; MORAES, M. F. D. Auditory fear conditioning modifies steady-state evoked potentials in the rat inferior colliculus. **Journal of neurophysiology**, v. 118, n. 2, p. 1012–1020, ago. 2017.

MALMIERCA, M. S. The Inferior Colliculus: A Center for Convergence of Ascending and Descending Auditory Information. **Neuroembryology and aging**, v. 3, n. 4, p. 215–229, 2004.

MALMIERCA, M. S. et al. A discontinuous tonotopic organization in the inferior colliculus of the rat. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 18, p. 4767–4776, 30 abr. 2008.

MALMIERCA, M. S. et al. Stimulus-specific adaptation in the inferior colliculus of the anesthetized rat. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 17, p. 5483–5493, abr. 2009.

MAREN, S. et al. N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for

both acquisition and expression of conditional fear in rats. **Behavioral neuroscience**, v. 110, n. 6, p. 1365–1374, dez. 1996.

MAREN, S.; YAP, S. A.; GOOSENS, K. A. The Amygdala Is Essential for the Development of Neuronal Plasticity in the Medial Geniculate Nucleus during Auditory Fear Conditioning in Rats. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 6, p. RC135–RC135, mar. 2001.

MARK, R. G.; HALL, R. D. Acoustically evoked potentials in the rat during conditioning. **Journal of neurophysiology**, v. 30, n. 4, p. 875–892, jul. 1967.

MARSH, R. A. et al. Projection to the inferior colliculus from the basal nucleus of the amygdala. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 23, p. 10449–10460, dez. 2002.

MCDONALD, A. J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Progress in neurobiology**, v. 55, n. 3, p. 257–332, jun. 1998.

MEEREN, H. K. M. et al. Auditory evoked potentials from auditory cortex, medial geniculate nucleus, and inferior colliculus during sleep–wake states and spike-wave discharges in the WAG/Rij rat. **Brain research**, v. 898, n. 2, p. 321–331, 20 abr. 2001.

METZGER, R. R. et al. Effects of reward and behavioral context on neural activity in the primate inferior colliculus. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 28, p. 7468–7476, jul. 2006.

MOBBS, D. et al. Viewpoints: Approaches to defining and investigating fear. **Nature neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 1205–1216, ago. 2019.

MORMANN, F. et al. Mean phase coherence as a measure for phase synchronization and its application to the EEG of epilepsy patients. **Physica D. Nonlinear phenomena**, v. 144, n. 3, p. 358–369, 1 out. 2000.

NABAVI, S. et al. Engineering a memory with LTD and LTP. **Nature**, v. 511, n. 7509, p. 348–352, 17 jul. 2014.

NOBRE, M. J. Changes on auditory physiology in response to the inactivation of amygdala nuclei in high anxiety rats expressing learned fear. **Physiology & behavior**, v. 118, p. 80–87, 13 jun. 2013.

NOBRE, M. J.; BRANDÃO, M. L. Modulation of auditory-evoked potentials recorded in the inferior colliculus by GABAergic mechanisms in the basolateral and central nuclei of the amygdala in high- and low-anxiety rats. **Brain research**, v. 1421, p. 20–29, nov. 2011.

NOBRE, M. J.; CABRAL, A.; BRANDÃO, M. L. GABAergic regulation of auditory sensory gating in low- and high-anxiety rats submitted to a fear conditioning procedure. **Neuroscience**, v. 171, n. 4, p. 1152–1163, 29 dez. 2010.

PAPE, H.-C. et al. Theta activity in neurons and networks of the amygdala related to

long-term fear memory. **Hippocampus**, v. 15, n. 7, p. 874–880, 2005.

PAPE, H. C.; PARÉ, D.; DRIESANG, R. B. Two types of intrinsic oscillations in neurons of the lateral and basolateral nuclei of the amygdala. **Journal of neurophysiology**, v. 79, n. 1, p. 205–216, jan. 1998.

PARÉ, D.; COLLINS, D. R. Neuronal correlates of fear in the lateral amygdala: multiple extracellular recordings in conscious cats. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 7, p. 2701–2710, 1 abr. 2000.

PARÉ, D.; COLLINS, D. R.; PELLETIER, J. G. Amygdala oscillations and the consolidation of emotional memories. **Trends in cognitive sciences**, v. 6, n. 7, p. 306–314, 1 jul. 2002.

PASTOR, M. A. et al. Activation of human cerebral and cerebellar cortex by auditory stimulation at 40 Hz. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 23, p. 10501–10506, 1 dez. 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition**. [s.l.] Elsevier, 2006.

PÉREZ-GONZÁLEZ, D. et al. GABAA-Mediated Inhibition Modulates Stimulus-Specific Adaptation in the Inferior Colliculus. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e34297, mar. 2012.

PÉREZ-GONZÁLEZ, D.; MALMIERCA, M. S.; COVEY, E. Novelty detector neurons in the mammalian auditory midbrain. **The European journal of neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 2879–2885, dez. 2005.

PICTON, T. W. et al. Human auditory steady-state responses. **International journal of audiology**, v. 42, n. 4, p. 177–219, jun. 2003.

PINTO, H. P. P. et al. Auditory processing assessment suggests that Wistar audiogenic rat neural networks are prone to entrainment. **Neuroscience**, v. 347, p. 48–56, 7 abr. 2017.

PINTO, H. P. P. et al. Seizure Susceptibility Corrupts Inferior Colliculus Acoustic Integration. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 13, p. 63, 6 nov. 2019.

QUIRK, G. J.; REPA, C.; LEDOUX, J. E. Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. **Neuron**, v. 15, n. 5, p. 1029–1039, nov. 1995.

ROBERTS, L. E.; BOSNYAK, D. J.; THOMPSON, D. C. Neural plasticity expressed in central auditory structures with and without tinnitus. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 6, p. 40, 28 maio 2012.

ROGAN, M. T.; STÄUBLI, U. V.; LEDOUX, J. E. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. **Nature**, v. 390, n. 6660, p. 604–607, dez. 1997.

ROMANSKI, L. M. et al. Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. **Behavioral neuroscience**, v. 107, n. 3, p. 444–450, jun. 1993.

- SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, p. 803–834, jul. 2003.
- SEIDENBECHER, T. et al. Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 846–850, 8 ago. 2003.
- SHAW, N. A. A possible collicular component of the auditory evoked potential and its relationship to brainstem and cerebellar auditory potentials. **Electromyography and clinical neurophysiology**, v. 32, n. 12, p. 579–590, dez. 1992.
- SIROTA, A. et al. Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm. **Neuron**, v. 60, n. 4, p. 683–697, nov. 2008.
- STUJENSKE, J. M. et al. Fear and safety engage competing patterns of theta-gamma coupling in the basolateral amygdala. **Neuron**, v. 83, n. 4, p. 919–933, ago. 2014.
- TYE, K. M. et al. Rapid strengthening of thalamo-amygdala synapses mediates cue-reward learning. **Nature**, v. 453, n. 7199, p. 1253–1257, 26 jun. 2008.
- VARELA, F. et al. The brainweb: Phase synchronization and large-scale integration. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 229–239, abr. 2001.
- VIDAL-GONZALEZ, I. et al. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. **Learning & memory**, v. 13, n. 6, p. 728–733, nov. 2006.
- WEISKRANTZ, L. Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 49, n. 4, p. 381–391, ago. 1956.
- WEISZ, N. et al. Tracking short-term auditory cortical plasticity during classical conditioning using frequency-tagged stimuli. **Cerebral cortex**, v. 17, n. 8, p. 1867–1876, ago. 2007.
- WINER, J. A. et al. Descending projections to the inferior colliculus from the posterior thalamus and the auditory cortex in rat, cat, and monkey. **Hearing research**, v. 168, n. 1-2, p. 181–195, jun. 2002.
- WOLFF, S. B. E. et al. Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition. **Nature**, v. 509, n. 7501, p. 453–458, maio 2014.
- ZHANG, L. et al. Distinct features of auditory steady-state responses as compared to transient event-related potentials. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e69164, 9 jul. 2013.

ANEXOS



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Márcio Flávio Dutra Moraes,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Dinâmica de respostas evocadas em regime permanente no recrutamento de redes em uma tarefa de condicionamento ao medo, submetido a esta comissão pelo protocolo 360 / 2015, a CEUA decidiu aprovar a sua solicitação.

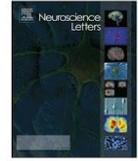
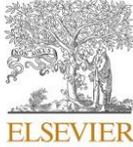
Justificativa: Aprovado na reunião do dia 07/12/2015.

Para acessar ao seu projeto clique no link:
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>
Belo Horizonte, 09/12/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br



Research article

Amygdala inhibition impairs fear conditioning but increases the stimulus-driven activity in the inferior colliculus

Cristiano Soares Simões^{a,1}, Flávio Afonso Gonçalves Mourão^{a,b,1},
Leonardo Oliveira Guarnieri^{a,b}, Matheus Costa Passos^a, Márcio Flávio Moraes^{a,b,*}

^a Núcleo de Neurociências, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

^b Centro de Tecnologia e Pesquisa em Magneto Ressonância, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Steady-state evoked potentials
Auditory fear conditioning
Inferior colliculus
Basolateral amygdala
Muscimol

ABSTRACT

It has been shown that fear conditioning improves the steady-state evoked potentials driven by a long lasting amplitude modulated tone in the inferior colliculus. In this work we tested the hypothesis that the amygdala modulates this effect, since it plays a crucial role in assessing the biological relevance of environmental stimuli. We inhibited the basolateral nucleus of the amygdala of rats by injecting a GABA_A receptor agonist (muscimol) before the recall test session of an auditory fear conditioning paradigm and recorded the evoked activity in the central nucleus of the inferior colliculus. According to our results, the treatment with muscimol decreased the expression of freezing behavior during the recall test session, but did not impair the entrainment of the evoked activity in the inferior colliculus induced by fear conditioning. We repeated the injection protocol with another group of rats but without pairing the tone to an aversive stimulus and observed that the inhibition of the basolateral amygdala enhances the stimulus-driven activity in the inferior colliculus regardless of the conditioning task. Our findings suggest that the basolateral amygdala exerts a tonic modulation over the encoding of sensory information at the early stages of the sensory pathway.

1. Introduction

The ability to selectively detect a relevant stimulus in the environment (e.g. an imminent threat) is crucial for adaptive behavior. Apart from innate responses, this ability relies on associative learning, which requires the precise correspondence between specific features of an otherwise neutral stimulus and its acquired emotional valence. Thus the expression of a proper behavioral response depends on the encoding of two streams of neural activity: The one driven by the incoming sensory inputs and that of internal networks triggered by the retrieval of similar past events [1,2].

Some features of the incoming stimuli are processed in the early stages of the sensory pathway [3] that are targeted by robust efferent projections from higher-level processing areas [4,5] and subjected to task-related plastic changes [6,7].

The inferior colliculus (IC) is the main midbrain nucleus in the

auditory pathway as it converges most of both the upstream and downstream information [8]. The structures upstream the auditory pathway that project back to the IC include the auditory cortex [9,5] and the basolateral nucleus of the amygdala (BLA) [10]. The latter is known to be crucially involved in fear learning as a selective detectors of aversive stimuli in the environment [11,12]. The inactivation of the (BLA), which impairs the expression of conditioned fear behaviors [13], has been reported to promote changes in the auditory evoked responses in the IC [14,15] and the IC activity itself has been implicated in the processing of aversive conditioned sounds [16], indicating a strong functional connectivity between these two structures.

Most of these studies have relied on transient evoked responses that are usually too short to overlap both the incoming activity and the feedback modulation from upstream areas or long-lasting pure tones [17] that overlap both but in a hardly distinguishable way. Previous studies got around this issue by showing that the IC activity can be

* Corresponding author at: Núcleo de Neurociências, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil.

E-mail address: mfdm@icb.ufmg.br (M.F. Moraes).

¹ These authors have contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135311>

Received 12 May 2020; Received in revised form 13 August 2020; Accepted 14 August 2020

Available online 17 August 2020

0304-3940/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.