



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

RODOLFO DOS SANTOS DA SILVA

IMUNORREATIVIDADE DE C-FOS EM ÁREAS
TELENCEFÁLICAS DO LAGARTO *Tropidurus hispidus* (SPIX,
1825) SUBMETIDO A UM ESTÍMULO AVERSIVO

São Cristóvão – SE

2021

RODOLFO DOS SANTOS DA SILVA

**IMUNOREATIVIDADE DE C-FOS EM ÁREAS TELENCEFÁLICAS DO
LAGARTO *Tropidurus hispidus* (SPIX, 1825) SUBMETIDO A UM ESTÍMULO
AVERSIVO**

Dissertação apresentada à banca de defesa, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal de Sergipe, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

Coorientadora: Dr^a Katty Anne Amador de Lucena Medeiros

SÃO CRISTÓVÃO – SE

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S586i Silva, Rodolfo dos Santos da
Imunoreatividade de c-Fos em áreas telencefálicas do lagarto
Tropidurus hispidus (SPIX, 1825) submetido a um estímulo
aversivo / Rodolfo dos Santos da Silva ; orientador José Ronaldo
dos Santos. – São Cristóvão, SE, 2021.
94 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) –
Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. Repteis. 2. Medo. 3. Neurobiologia. I. Santos, José Ronaldo
dos, orient. II. Título.

CDU 612.821:598.112

RODOLFO DOS SANTOS DA SILVA

**IMUNORREATIVIDADE DE C-FOS EM ÁREAS TELENCEFÁLICAS DO
LAGARTO *Tropidurus hispidus* (SPIX, 1825) SUBMETIDO A UM ESTÍMULO
AVERSIVO.**

Dissertação apresentada à banca de defesa, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal de Sergipe, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

Coorientadora: Dr^a Katty Anne Amador de Lucena Medeiros

Prof^o Dr^o José Ronaldo dos Santos (UFS)

Presidente da Banca

Prof^o Dr^o Hector Julián Tejada Herrera (UFS)

Avaliador Interno

Prof^o Dr^o Eduardo José dos Reis Dias (UFS)

Avaliador Externo

SÃO CRISTÓVÃO

2021

AGRADECIMENTOS

Primeiro à Deus, ao universo, ao fluxo de energia que segue, independente de minhas ações, por me permitir sintonizar com suas frequências, às vezes, e me fazer seguir na direção correta.

Ao meu orientador e amigo Prof^o. Dr^o. José Ronaldo dos Santos, que nos últimos 8 anos me permitiu estar ao seu lado na ciência, e na vida social, compartilhando sabedoria sobre mais áreas do que eu achei que uma pessoa pudesse dominar. Sem ele eu ainda seria alguém influenciado pela maré que arrasta para qualquer direção e nunca tem o controle de nada. Graças a ele, eu saí de jovem inexperiente, no mundo acadêmico e pessoal, para alguém que não chegou ainda onde quer, mas agora sabe como posso chegar lá. Sem ele, eu teria desistido no primeiro relatório errado e na primeira decepção com a vida. Hoje, eu sei que muita coisa ainda vai acontecer, mas estarei preparado para aprender com meus acertos e mais ainda com meus erros. A ele, meu mais sincero obrigado pelo que hoje eu me tornei.

A minha amiga, também mentora e sábia, Dr^a Katty Anne Amador de Lucena Medeiros, que mesmo ainda tendo que corrigir essa versão que vocês estão lendo, e provavelmente virá cheio de marcações vermelhas e puxões de orelha, foi uma parceira e tanto nas capturas de lagartos para experimento, nos conselhos sobre a vida e na capacidade de me confortar quando eu pensei em desistir (mesmo que ela nem saiba quais foram essas vezes). A ela, todo o meu respeito e amizade com o passar dos anos.

A meus amigos do laboratório LNFS e LaNCE, que estivemos juntos desde a iniciação científica, fazendo experimentos, manutenção dos animais, e dividindo o peso dos relatórios e da vida: João Melo, Heitor Franco, Milena Monteiro e Thiago Henrique.

A meus amigos e companheiros de pesquisa, que nos últimos 8 anos, passaram pela minha vida e contribuíram com a amizade, estatística, esporro, conselho e viagens (poucas, mas foram ótimas viagens): Thassyia Fernanda,

Auderlan Mendonça, Marcos Menezes, Lívia Cristina, Edson Rezende, Edson Lima, Marina Freire, Pollyana Leal, Luciano Gois, Roberta Abritta, Leandro Santos.

A meus amigos da iniciação científica, que mostraram mesmo entrando agora na ciência, que eles têm muito potencial para a grandeza e muito conhecimento para compartilhar: Abraão, Mylaine, Gabriel, Micaelle, Wesley, e todos da iniciação que não citei, mas tenho igual apreço.

A meus amigos do PROCFIS e de outros programas, que se eu fosse citar o nome de cada um deles, 10 páginas não seriam o suficiente. Então se você que faz parte de algum programa e já teve algum momento comigo, saiba que super te valorizo pela amizade, pelas resenhas e crescimento que tivemos ao longo desses 2 últimos anos, incluindo nosso ilustre e querido ex secretário Renivan e nossa atual secretária Thais.

A meus amigos do curso de biologia que, mesmo após a graduação, mantivemos o mesmo laço de sempre a cada encontro ou por mensagem.

A Marcelo Menezes que nos últimos anos foi um excelente amigo e um péssimo perdedor em todos os jogos.

A Laíza Santana que em um ano nos aproximamos pela ciência, e de lá pra cá se mostrou mais que uma amiga na ciência, foi uma amiga pra vida também.

A meus amigos de Salvador que apesar de pensar em muitos nomes, Raiana Oliveira, Edvaldo Júnior e Lurian Henrique foram os que mais presenciaram minha vida nos últimos tempos. A eles minha memória mesmo que distantes.

A toda minha família, pelo apoio, incluindo minhas duas mães, meus dois pais, minhas irmãs e meus irmãos, que sempre torceram por mim, mesmo quando não faziam ideia do trabalho que era a pesquisa com lagartos. A eles o meu amor, em especial a Iara Santos, e Jussara Santos.

Este parágrafo, dedico às pessoas que já não estão mais em minha vida por algum motivo, mas pude aprender muito com cada uma delas, a como ser

uma pessoa melhor, e tentar evoluir a cada experiência. A essas, meu mais sincero obrigado, pela paciência e companheirismo até onde o tempo permitiu.

A meus vizinhos Júnior, Kelwin e Brenda, porque o prédio não teria sido tão feliz nos últimos anos sem eles ali, parede a parede.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, que juntamente, ao CNPq, financiaram essa pesquisa, sem o qual esse projeto não poderia ter sido desenvolvido, e a Universidade Federal de Sergipe pelos espaços cedidos para a realização de todas as etapas desse projeto.

A sociedade que contribuiu com seus impostos e isso me permitiu estar em uma universidade com estrutura para desenvolver meu projeto. Os frutos desse trabalho são resultados do esforço de vocês também.

Este espaço eu dedico em respeito e memória aos animais que participaram do meu projeto. Cada vida que aqui passou teve uma contribuição fundamental para entender como o cérebro funciona e sua evolução.

A mim. Eu queria poder contar todas as dificuldades, tristezas profundas, vontade de sumir do mundo, desafios, superações, alegrias, sorrisos bobos, risadas escandalosas á você Rodolfo do futuro. Mas assim como tudo que você internalizou até hoje e não deixou muitos registros disso, essa será também situação igual. Espero de verdade que você seja feliz como não foi em muitos momentos da vida <3. Te amo muito, e me perdoa por sempre te deixar como última opção. Espero que um dia se alguém no futuro distante ler isso, chegue para você e desencadeie as memórias desses últimos anos proferindo apenas uma palavra: *Bankai*.

Por último, mas não menos importante, ao Prof^o. Dr^o. Murilo Marchioro, que abriu as portas do laboratório para todos, incluindo a mim, e hoje só somos o que somos graças a capacidade dele de unir as pessoas e de evoluir espiritualmente a cada evento do laboratório.

“Trabalhamos nas trevas para servir a luz”

(Assassins Creed)

RESUMO

Imunorreatividade de c-Fos em áreas telencefálicas do lagarto *Tropidurus hispidus* (SPIX, 1825) submetido a um estímulo aversivo. Rodolfo dos Santos da Silva. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PROCFIS), 2021.

Introdução: O medo é caracterizado como a resposta fisiológica e comportamental frente a um estímulo que apresente perigo ao indivíduo. Nos animais, um dos comportamentos tipo medo mais observado é o de congelamento. A fim de saber quais áreas cerebrais podem estar modulando esse e outros comportamentos, a avaliação da imunorreatividade para a proteína c-Fos é um modelo já consolidado na literatura. No grupo dos répteis, há uma escassez de estudos que abordam a neurobiologia do medo. Contudo, pesquisas nessa área são necessárias para a compressão da neurocircuitaria envolvida na modulação desse comportamento. Logo, o presente estudo teve por **objetivo** avaliar a imunorreatividade para c-Fos nas áreas telencefálicas desses animais após serem expostos ao estímulo aversivo citado, e como essas áreas podem estar relacionadas ao comportamento tipo medo. **Metodologia:** Todos os protocolos foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais sob o número 26/2016. Foram utilizados 18 animais divididos em 3 grupos: Grupo Controle (CTR) – animais que não passaram pelo teste comportamental, Grupo Estímulo Neutro (EN) – animais que foram expostos a uma gaiola vazia, e Grupo Estímulo Aversivo (EA) – animais que foram expostos a uma gaiola contendo um gato doméstico dentro. Após 5 dias de ambientação ao laboratório, os animais, foram expostos a um campo aberto por 10 minutos (Fase de habituação) e logo em seguida por 10 minutos a seu respectivo estímulo (Fase de exposição). Parâmetros comportamentais (distância percorrida, tempo de imobilidade, latência para o primeiro deslocamento, latência para o primeiro movimento e número de quadrantes visitados) foram coletados e 90 min após um dos respectivos estímulos, os animais foram perfundidos e os cérebros removidos para processamento da imunorreatividade para c-Fos. **Resultados:** Os dados comportamentais mostraram que o grupo EA ao ser comparado com o grupo EN na exposição teve: menor distância percorrida, maior tempo de congelamento e maior latência para iniciar um deslocamento, diferença essa não observada na latência para iniciar um movimento. Quanto aos dados de contagem de células para a marcação da proteína c-Fos, o grupo EA mostrou um aumento do número de células c-Fos positivas quando comparado ao EN ou ao CTR nas áreas: Córtex Medial, Córtex Dorsomedial, Córtex Lateral, Amígdala, Estriado, Septo, e Região Ventricular Dorsal Posterior. Além disso foi possível observar uma correlação negativa entre o número de células ativadas na Amígdala e Septo, com a

distância percorrida. **Conclusão:** Os resultados comportamentais e de contagem de células sugerem que há interação entre as áreas citadas e os comportamentos de medo do lagarto *Tropidurus hispidus*, quando exposto a um estímulo aversivo.

Palavras-chave: Répteis; Medo; Neurobiologia.

ABSTRACT

c-Fos immunoreactivity in telencephalic areas of the lizard *Tropidurus hispidus* (SPIX, 1825) submitted to an aversive stimulus. Rodolfo dos Santos da Silva. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PROCFIS), 2021.

Introduction: Fear is characterized as the physiology and behavioral response face to a stimulus that act as a danger to the individual. In animals, one of the fear-like behavior most observed is freezing. In order to know which brain areas may be modulating this and other behaviors, evaluating the immunoreactivity for c-Fos protein is a model already consolidated in the literature. In the reptile's group, there is a paucity of studies that address the neurobiology of fear, However, research in this area is needed for the compression of the neurocircuitry involved in the modulation of this behavior. Therefore, present study **aimed** to evaluate the immunoreactivity for c-Fos in the telencephalic areas of these animals after being exposed to the aforementioned aversive stimulus and how these areas might be related to fear-like behavior. **Methodology:** All protocols were duly approved by the Animal Research Ethics Committee under number 26/2016. Eighteen animals were divided into 3 groups: Control Group (CTR) - animals that did not pass the behavioral test, Neutral Stimulus Group (EN) - animals that were exposed to an empty cage, and Aversive Stimulus Group (EA) - animals that were exposed to a cage containing a domestic cat inside. Após 5 dias de ambientação ao laboratório, os animais, foram expostos a um campo aberto por 10 minutos (Fase de habituação) e logo em seguida por 10 minutos a seu respectivo estímulo (Fase de exposição). Parâmetros comportamentais (distância percorrida, tempo de imobilidade, latência para o primeiro deslocamento, latência para o primeiro movimento e número de quadrantes visitados) foram coletados e 90 min após um dos respectivos estímulos, os animais foram perfundidos e os cérebro removidos para processamento da imunorreatividade para c-Fos. **Results:** Behavioral data showed that the EA group, when compared to the EN group in the exposure, had: shorter distance walked, longer freezing time and longer latency to initiate a movement, a difference that was not observed in the latency to initiate a movement. As for cell count data for c-Fos protein labeling, the EA group showed an increase in the number of c-Fos positive cells when compared to EN or CTR in the following areas: Medial Cortex, Dorsomedial Cortex, Lateral Cortex, Amygdala, Striate, Septum, and Posterior Dorsal Ventricular Region. Furthermore, it was possible to observe a negative correlation between the number of activated cells in the Amygdala and Septum, with the distance covered. **Conclusion:** The behavioral and cell count results suggest that there is an interaction between the aforementioned areas and the fear behaviors of the lizard *Tropidurus hispidus*, when exposed to an aversive stimulus.

Key Words: Reptiles; Fear; Neurobiology

Resumo social

Imunorreatividade de c-Fos em áreas telencefálicas do lagarto *Tropidurus hispidus* (SPIX, 1825) submetido a um estímulo aversivo. Rodolfo dos Santos da Silva. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PROCFIS), 2021.

Sentir medo é uma emoção humana que pode ser expressa com o aumento de fatores fisiológicos como batimentos cardíacos, respiração, acompanhado ou não de fatores comportamentais como tentativa de fuga do local ou estado de congelamento. Nos animais esses comportamentos são importantes para a sobrevivência. Sabendo que o cérebro é dividido em muitas áreas e elas podem atuar conjuntamente para que o indivíduo lide com a situação de perigo, uma das formas de avaliar qual(is) áreas estão envolvidas nos comportamentos analisados, é através da marcação da proteína c-Fos. Essa localização pode ser considerada como uma imagem funcional do cérebro, mas com melhor resolução. No grupo dos répteis, no qual os lagartos estão incluídos, os estudos são escassos e não se aprofundam no funcionamento do cérebro destes quando expostos a uma situação de perigo. Nesse sentido, essa dissertação objetivou observar como a marcação da proteína c-Fos está distribuída no cérebro do lagarto *Tropidurus hispidus*, quando colocado frente a um estímulo aversivo (gato doméstico). Para isso, 6 lagartos foram colocados de frente a uma gaiola vazia, 6 a uma gaiola que tinha um gato dentro, e 6 não foram submetidos a nenhum experimento. Foi observado se os animais ficavam muito parados e quantos metros eles andavam quando se mexiam. Depois disso, quando analisamos esses dados, percebemos que os lagartos que foram expostos a gaiola com gato mostraram ter comportamento tipo medo pois caminhavam menos no local onde foram colocados. Os lagartos que foram expostos só a gaiola vazia não mostraram isso. Quando analisamos o cérebro de todos, percebemos que algumas áreas cerebrais chamadas de áreas telencefálicas podem ter contribuído para que os animais respondessem ao comportamento aversivo. A conclusão é que os resultados que observamos aqui aumentaram o conhecimento de como o cérebro do lagarto funciona diante de uma situação de perigo, e que algumas áreas deste cérebro mantêm funções preservadas e que também são encontradas em outros animais.

Palavras-chave: Répteis; Medo; Neurobiologia..

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Processamento de informações de aspectos aversivos que resultam na resposta de medo. A informação chega à amígdala basolateral através da ligação com o hipotálamo e com córtex associativo. A partir disso, projeções glutamatérgicas e gabaérgicas serão direcionadas a vários locais alvo modulando a informação. ABL, amígdala basolateral; BLV, Amígdala ventrolateral; CeL, núcleo lateral da amígdala; CeM, núcleo medial da amígdala; diTC, células intercaladas dorsais; viTC, células intercaladas ventrais; iITC, células intercaladas laterais; mPFC, córtex pré-frontal medial; TeA, córtex associativo; SOM+, neurônios somatostatina positivos; PKC δ +, neurônios que possuem proteína quinase C delta-positivo. Adaptado de LEE; LEE; KIM, (2016)..... 9
- Figura 2:** Homologia hipocampal entre lagartos (répteis) e ratos (mamíferos). Adaptado de MACÊDO-LIMA, 2013..... 14
- Figura 3:** *Tropidurus hispidus* (SPIX, 1825). Fonte: Retirado de Santos (2016). 19
- Figura 4:** Terrário de acomodação para o lagarto *Tropidurus hispidus*. Fonte: Arquivo pessoal..... 23
- Figura 5:** Modelo para avaliar memória aversiva. A) Fase de habituação, onde os animais Estímulo Neutro (EN) e Estímulo Aversivo (EA) permaneceram por 10 minutos. B) Fase de exposição, onde os animais do Estímulo Neutro (EN) foram expostos por 10 minutos a uma gaiola vazia, e B) os animais do Estímulo Aversivo (EA) foram expostos por 10 minutos a uma gaiola contendo um gato doméstico dentro. Fonte: Arquivo pessoal. 25
- Figura 6:** Distância percorrida pelos animais do grupo Estímulo Neutro (EN), e Estímulo Aversivo (EA), nas fases habituação e exposição. Os dados são expressos como mediana e intervalos interquartis. Foram utilizados os testes de Wilcoxon (para medidas repetidas) e Mann-Whitney e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos..... 30

Figura 7: Tempo de imobilidade apresentado pelos animais do grupo Estímulo Neutro (EN) e Estímulo Aversivo (EA), nas fases habituação e exposição. Os dados são expressos como mediana e intervalos interquartis. Foram utilizados os testes de Wilcoxon (para medidas repetidas) e Mann-Whitney, e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. 31

Figura 8: Latência para o primeiro deslocamento realizado pelos animais do grupo Estímulo Neutro (EN) e Estímulo Aversivo (EA), nas fases habituação e exposição. Os dados são expressos como mediana e intervalos interquartis. Foram utilizados os testes de Wilcoxon (para medidas repetidas) e Mann-Whitney e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. 32

Figura 9: Latência para o primeiro movimento realizado pelos animais do grupo Estímulo Neutro (EN) e Estímulo Aversivo (EA), nas fases habituação e exposição. Os dados são expressos como mediana e intervalos interquartis. Foram utilizados os testes de Wilcoxon (para medidas repetidas) e Mann-Whitney e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. 33

Figura 10: Número total de quadrantes visitados pelos animais tanto do grupo Estímulo Neutro, quanto Estímulo Aversivo, nas fases habituação e exposição. Os dados são expressos como mediana e intervalos interquartis. Foram utilizados os testes de Wilcoxon (para medidas repetidas) e Mann-Whitney e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. 34

Figura 11: Número de células c-Fos positivas em diferentes áreas do córtex do lagarto *Tropidurus hispidus* após submetido ao protocolo de estímulo aversivo. Essas áreas são: **A)** Córtex medial; **B)** Córtex Dorsomedial; **C)** Córtex Dorsal; **D)** Córtex Lateral; **E)** Região Ventricular Dorsal Posterior; **F)** Amígdala; **G)** Estriado; **H)** Septo. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. Foi utilizado ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey. Sinalizados estão os grupos em que foi observado diferença em relação ao grupo CTR (*), e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. 36

Figura 12: Imagens representativas das áreas hipocâmpais do lagarto *Tropidurus hispidus* após exposição ao protocolo de estímulo aversivo. As áreas representadas são: Córtex Medial, Córtex Dorsomedial, Córtex Dorsal e Córtex Lateral. 37

Figura 13: Imagens representativas das áreas hipocampais do lagarto *Tropidurus hispidus* após exposição ao protocolo de estímulo aversivo. As áreas em questão são: Amígdala, Região Ventricular Dorsal Posterior, Estriado e Septo. Foi realizada Imunohistoquímica para a proteína c-Fos e as setas pretas indicam neurônios que apresentaram essa proteína..... 38

Figura 14: Correlação entre áreas hipocampais e não hipocampais do lagarto *Tropidurus hispidus* sendo essas correções: (A) CM x ESTR, (B) CDM X CD, (C) CDM X AMIG, (D) CD X CL, (E) CD X ESTR, (F) CL X ESTR, (G) AMIG X RVDP, (H) AMIG X SEPT, (I) RVDP X SEPT, (J) RVDP X CDM, (K) SEPT X ESTR, (L) SEPT X CDM, (M) ESTR X AMIG, (N) ESTR X CDM. Teste de correlação de Pearson foi aplicado e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. CM – Córtex Medial; CDM – Córtex Dorsomedial; CD – Córtex Dorsal; CL – Córtex Lateral; AMIG – Amígdala; RVDP – Região Ventricular Dorsal Posterior; SEPT – Septo; ESTR – Estriado. 40

Figura 15: : Representação gráfica da correlação entre todas as áreas hipocampais e não hipocampais. Foi utilizado o algoritmo Atlas 2 do programa Gephi, que organiza as áreas baseada em quantas correlações esta possui com outras áreas. CM – Córtex medial; CDM – Córtex dorso medial; CD – Córtex dorsal; CL – Córtex lateral; AMÍG – Amígdala; RVDP – Região ventricular dorsal posterior; ESTR – Estriado; SEPT - Septo..... 41

Figura 16: Representação gráfica da correlação entre os comportamentos do *T.hispidus* após exposição a um estímulo neutro ou aversivo e as áreas hipocampais e não hipocampais. Foi utilizado o algoritmo Atlas 2 do programa Gephi, que organiza os dados baseado em quantas correlações possui com outras áreas. CM – Córtex medial; CDM – Córtex dorso medial; CD – Córtex dorsal; CL – Córtex lateral; AMÍG – Amígdala; RVDP – Região ventricular dorsal posterior; ESTR – Estriado; SEPT – Septo; DIST – Distância percorrida; MOVI – Latência para o primeiro movimento; DESL – Latência para o primeiro deslocamento; IMOB – Tempo de imobilidade (ou congelamento); QUAD – Número de entrada nos quadrantes..... 43

Figura 17: Representação gráfica da correlação entre os comportamentos do *T.hispidus* após exposição a um estímulo neutro ou aversivo e todas as áreas

hipocampais e não hipocampais. Foi utilizado o algoritmo Atlas 2 do programa Gephi, que organiza os dados baseado em quantas correlações possui com outras áreas e comportamentos. CM – Córtex medial; CDM – Córtex dorso medial; CD – Córtex dorsal; CL – Córtex lateral; AMÍG – Amígdala; RVDP – Região ventricular dorsal posterior; ESTR – Estriado; SEPT – Septo; DIST – Distância percorrida; MOVI – Latência para o primeiro movimento; DESL – Latência para o primeiro deslocamento; IMOB – Tempo de imobilidade (ou congelamento); QUAD – Número de entrada nos quadrantes. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Correlação entre o número de células c-Fos positivas e dados comportamentais dos parâmetros: Distância percorrida, Tempo de imobilidade, Latência para o primeiro movimento deslocamento e Latência para o primeiro movimento. Foi aplicado teste de correlação de Pearson, e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. CDM – Córtex dorso medial; CL – Córtex lateral; AMÍG – Amígdala; RVDP – Região ventricular dorsal posterior; ESTR – Estriado; SEPT - Septo. 42

Lista de Abreviaturas e Siglas

- ABL – Amígdala basolateral
- AC – Adenilato ciclase
- ADL – Amígdala dorsolateral
- AMÍG – Amígdala
- AMPC – Adenosina monofosfato cíclico
- AP-1 – Complexo de proteínas de ativação 1
- AP5 – Ácido D(-)-2-amino-5-fosfopentanóico
- ATSA – Área de transição estriato-amigdalóide
- BO – Bulbo olfatório
- BLV - Amígdala ventrolateral
- CA⁺⁺ - Cálcio
- CA1 – Corno de ammon 1
- CA2 – Corno de ammon 2
- CA3 – Corno de ammon 3
- CB - Cerebelo
- CeA – Núcleo central da amígdala
- CM – Córtex medial
- CDM – Córtex dorsomedial
- CD – Córtex dorsal
- CDX – Doublecortina
- CE – Córtex Entorrinal
- CeL – Núcleo lateral da amígdala
- CeM – Núcleo medial da amígdala
- c-fos* – Gene precursor da proteína c-Fos
- c-Fos - Proteína produto da tradução gênica *c-fos*
- C-Jun – Família de proteínas
- CL – Córtex lateral

CPF – Córtex pré-frontal
CRE – Unidade receptora para o fator de transcrição CREB
CREB – Fator de transcrição gênica
diTC - Células intercaladas dorsais
ESTR – Estriado
GD – Giro denteado
HP - Hipocampo
HYP – Hipotálamo
ilTC - Células intercaladas laterais
LC – *Locus coeruleus*
LaNCE - Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva
LNFS – Laboratório de Neurofisiologia
MAPK/ERK – Vias de ativação de processos no neurônio
mRNA – RNA mensageiro
NAL – Núcleo amigdalóide lateral
NCX – Neocórtex
NE – Núcleo esférico
NMDV – Núcleo motor dorsal do vago
NLET – Núcleo leito da estria terminal
NMDA – N-metil D-aspartato
NO – Óxido nítrico
NP – Núcleo parabraquial
NRCP – Núcleo reticular caudal pontino
PAG – Substancia cinzenta periaquedutal
PE – Camada plexiforme externa
PI – Camada plexiforme interna
PKC δ + - Neurônios que possuem proteína quinase C delta-positivo
RVDA – Região ventricular dorsal anterior
RVDP – Região ventricular dorsal posterior

SEPT – Septo

SOM+ - Neurônios somatostatina positivos

TE – Tronco encefálico

TeA - Córtex associativo

vICT - células intercaladas ventrais

zif-268 – Gene precursor da proteína Zif-268

Zif-268 - Proteína produto da tradução gênica do *zif-268*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	5
2.1	Objetivo Geral	5
2.2	Objetivos Específicos	5
3	REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1	Neurobiologia do medo	7
3.2	Evolução do sistema nervoso e homologais telencefálicas em lagartos 11	
3.2.1	c-Fos como marcador de atividade neuronal.....	16
3.2.2	<i>Tropidurus hispidus</i> como modelo no estudo de memória	19
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Aspectos éticos	22
4.2	Animais	22
4.3	Delineamento experimental.....	23
4.3.1	Preparo das amostras	26
4.3.2	Descarte de material biológico.....	26
4.3.3	Imunohistoquímica para a proteína c-Fos	27
4.3.4	Aquisição e análise das imagens.....	27
4.3.5	Análise de dados	28
5	RESULTADOS	29
5.1	Teste comportamental: exposição do lagarto <i>T. hispidus</i> a um estímulo aversivo.....	29
5.2	Marcação de neuronios c-Fos positivos em diferentes áreas telencefálicas em reposta a exposição a um estímulo neutro ou aversivo. 34	
5.3	Correlação entre áreas telencefálicas do lagarto <i>Tropidurus hispidus</i> após exposição a um estímulo aversivo ou neutro	38
5.4	Relação entre comportamento e ativação de áreas telencefálicas após exposição a um estímulo neutro ou aversivo.	41
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÃO	57
8	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	57
9	PERSPECTIVAS PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	58
	Referência	58

1 INTRODUÇÃO

O medo é caracterizado como uma resposta fisiológica acompanhado de uma mudança comportamental em um indivíduo frente a uma situação de perigo (BOISSY, 1995). Nos animais, essas respostas consideradas tipo medo podem ajudar na sobrevivência a um predador ou situação que possa comprometer sua estrutura física. Dos comportamentos tipo medo, podem ser destacados desde um estado de congelamento, com a finalidade de não ser detectado pela origem do estímulo aversivo, até a tentativa de escapar da situação emitindo sons e atacando essa origem (Revisado por PERUSINI; FANSELOW, 2015; MISSLIN, 2003).

Nos mamíferos, pesquisas visam compreender a neurobiologia do medo, por meio de estudos sobre a neuroanatomia, envolvendo as vias ativadas durante o processo e como a aplicação de fármacos podem influenciar nesse mecanismo (CALIXTO et al., 2008; GAFFORD; RESSLER, 2016; OKUBO et al., 2018). Entretanto, apesar de bem estabelecido para esse grupo evolutivo, outros grupos menos derivados, como o dos répteis, ainda apresentam dificuldades em ter seus processos fisiológicos de resposta ao medo elucidados, uma vez que os trabalhos são escassos e não abordam profundamente o tema mencionado. Compreender como esse e outros processos ocorrem é importante para avaliar como esses mecanismos evoluíram nos diferentes grupos animais.

Entre as estruturas que contribuem para a expressão do comportamento tipo medo, ou memórias formadas a partir disso, podem ser destacadas o hipotálamo (HYP), o hipocampo (HP) e a amígdala (AMÍG). A AMÍG é o principal centro modulador em mamíferos (GAFFORD; RESSLER, 2016), e esta envia projeções para áreas como: núcleo reticular caudal pontinho (NRCP), substância cinzenta periaquedutal (PAG), *locus coeruleus* (LC), núcleo parabraquial (NP) e outros, que no final, modulam direta ou indiretamente, alterações cardiovasculares, respiratórias, de sensopercepção, comportamentais e formação de memórias do tipo aversivas (CARRIVE; LEE; SU, 1999; DAVERN, 2014; SATO et al., 2015).

Adolphs *et al.*, (1994) mostraram o papel substancial que a AMIG desempenha no contexto de medo ao analisar uma paciente humana chamada de SM, mulher de 30 anos que possuía uma doença na qual toda a área amigdalóide foi inativada. SM era incapaz de reconhecer expressão de medo no rosto de outras pessoas, assim como não era apta a relatar quais características em comum possuía um rosto que apresentasse diferentes emoções em diferentes momentos.

Homologamente, existe uma relação entre a AMIG de mamíferos e uma parte do cérebro dos répteis. Laurent *et al.*, (2016), mostraram que regiões do cérebro de répteis como o núcleo amigdalóide lateral (NAL), a amígdala dorsolateral (ADL) e a região ventricular dorsal posterior (RVDP) possuem tipos de neurônios e projeções que podem ser inferidas como semelhantes à amígdala basolateral (ABL) em mamíferos. Além disso, outras áreas no cérebro dos répteis, como a área de transição estriado-amigdalóide (ATSA), córtex medial (CM), córtex dorsomedial (CDM) e córtex dorsal (CD) podem também estar envolvidas tanto na modulação quanto na formação dessas memórias de medo ao contexto (LANUZA, 1998; DAVIES *et al.*, 2002; SANTOS, 2016; SANTOS, 2018). Entretanto, os dados disponíveis na literatura não elucidam de maneira aprofundada como essas áreas se correlacionam, nem seu mecanismo fisiológico.

Juntamente às áreas relacionadas ao comportamento tipo medo, os répteis, com ênfase nos lagartos, podem exibir diversas maneiras de se portar frente a uma situação de perigo. Machado, Galdino e Sousa, (2007) em um ensaio com a espécie de lagarto *Tropidurus montanus* observaram que perante um ataque de predador ou sua presença, os animais podem: fugir do local de ataque, eliminar fluidos pela cloaca, morder o predador, agitar a cauda, perder a cauda, inflar o corpo, ou entrar em estado de congelamento para que não seja detectado pelo estímulo aversivo.

Nunes, Elisei e Sousa (2012), estudando a espécie *Tropidurus itambere* relataram que frente a uma situação de possível predação, os animais podem expandir o saco gular, forçar rotas de escape caso o predador o tenha contido

e um espaço fechado, excretar o conteúdo cloacal, movimentar a cauda, fingir-se de morto, e morder.

Desses comportamentos citados, o movimento de cauda serve para desviar a atenção do predador para regiões vitais como cabeça e tórax, enquanto que fingir-se de morto pode dar a presa uma possibilidade de que o predador perca o interesse, visto que alguns desses atacam e se alimentam de presas que se movimentam.

Apesar dos comportamentos citados serem observados frente à situações de perigo, ainda podem ser utilizado para comunicação entre indivíduos da própria espécie, como foi observado por Coelho, Bruinjé e Costa, (2018), onde foram colocados lagartos da espécie *Tropidurus semitaeniatus* em um mesmo local e observado comportamentos de dominância, exploração, e submissão de um para o outro. Nesse estudo, os animais eram postos em pares dentro de um campo aberto, e então a divisória entre eles foi removida e os comportamentos analisados foram: movimento vertical de cabeça, lambar o solo, se mover em direção ao outro de maneira rápida ou devagar, exibir a parte dorsal do corpo, perseguir, morder, lutar, balançar a cauda, e se afastar do outro lagarto.

O movimento vertical de cabeça foi visto em dois momentos, sendo o primeiro deles quando a divisória foi liberada e esse comportamento estabelecido para comunicação, enquanto que em segundo momento, após um conflito, o animal vencedor da disputa exibia maior frequência desse comportamento como uma possível reafirmação de sua dominância.

Lambar o solo foi visto nos momentos pós conflito onde o vencedor da disputa também exibia esse comportamento, sendo sugerido como um comportamento no qual avalia as pistas química vindo do lagarto submisso e se esse poderia ainda apresentar alguma ameaça ao território conquistado pelo primeiro.

Balançar a cauda foi visto de forma distrair o oponente dos locais onde seriam mordidos, pois ao balançar a cauda e exibi-la para o oponente, a

probabilidade do oponente morder a cauda deste foi maior do que outra região do corpo.

Se afastar do oponente se deu quando durante uma disputada o lado perdedor exibiu comportamentos de submissão, sendo um destes o de se afastar do dominante.

É importante aqui ressaltar que os comportamentos citados em estudos anteriores serviram tanto para situações frente a um predador quanto frente a um coespecífico, logo é possível sugerir que esses mesmos comportamentos possuem funções diferentes a depender da situação em que se encontram. Um dos objetivos dos estudos com base na neurociência é identificar como o cérebro reage para exibir os mesmos comportamentos em diferentes situações.

Uma das formas de avaliar quais áreas cerebrais, estão ativas exercendo função sobre o indivíduo diante dos comportamentos acima, é através da técnica de marcação imunorreativa para a proteína c-Fos. Durante a realização de um comportamento e participação de áreas cerebrais envolvidas neste, trabalhos como o de Filipkowski *et al.*, (2000) e Siqueira *et al.*, (2019), mostraram que essa proteína é expressa entre 90 e 120 minutos no cérebro de ratos e lagartos, respectivamente, após um determinado estímulo.

A proteína c-Fos age no núcleo da célula, regulando genes envolvidos no processo de plasticidade sináptica, como por exemplo o gene *zif-268* (PRADO; BEL, 1998; ALENAZI; IBRAHIM; BRISKI, 2015). A proteína produto da transcrição do mRNA em questão, a Zif-268, foi utilizada no trabalho de Santos (2016) como marcador para plasticidade neural nos lagartos *Tropidurus hispidus* ao serem expostos a uma gaiola vazia e a uma gaiola contendo um gato dentro. No trabalho citado, foi possível observar que áreas do hipocampo reptiliano, como o CM e CD, apresentam alta imunorreatividade dessa proteína, assim como na AMIG, e estas podem estar envolvidas nos processos de formação e evocação de memórias do tipo aversivas.

A espécie de lagarto citada possui uma ampla distribuição geográfica (ALBUQUERQUE *et al.*, 2018), fácil manuseio e tem sido estudada como modelo animal em trabalhos que envolvem desde sua alimentação,

endoparasitose, comportamentos defensivos, e comportamentos sociais (VITT; ZANI; CALDWELL, 1996; DÍAZ-URIARTE, 1999; PRIETO, 1980).

Os grupos de pesquisa, os quais faço parte, Laboratório de Neurofisiologia (LNFS) e o Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva (LaNCE), coordenado pelos professores doutores José Ronaldo dos Santos e Murilo Marchioro, já vem estudando as características neuroanatômicas, aspectos da formação de memória e respostas comportamentais tipo medo nessa espécie, o que a caracteriza como um bom modelo para que além de aumentar o conhecimento sobre essa espécie, permite uma melhor compreensão neurobiológica quanto a memória e o comportamento tipo medo (MEDEIROS, 2019; SANTOS, 2018; SANTOS, 2016; MACÊDO-LIMA, 2013; PIMENTEL, 2014; PIMENTEL et al., 2021; SANTOS, 2010).

Nossa hipótese então é que as áreas telencefálica dessa espécie estão envolvidas na expressão do comportamento tipo medo.

Nesse sentido, a presente dissertação traz a singularidade de informações sobre quais áreas podem estar envolvidas na expressão do comportamento tipo medo em lagartos da espécie *T. hispidus*, quando submetido a um estímulo aversivo, utilizando para isso a técnica de imunorreatividade para a proteína c-Fos como marcador de atividade neuronal, além de dados comportamentais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o padrão de imunorreatividade de c-Fos no telencéfalo e sua relação com as respostas comportamentais do lagarto *T. hispidus* quando submetido a um estímulo aversivo.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a resposta comportamental do lagarto *Tropidurus hispidus* após ser submetido a um estímulo aversivo;
- Quantificar a imunorreatividade para a proteína c-Fos nas áreas telencefálicas do lagarto *Tropidurus hispidus* após um estímulo aversivo;
- Correlacionar a imunorreatividade para c-Fos em diferentes áreas telencefálicas com o comportamento do *Tropidurus hispidus* após ser submetido a um estímulo aversivo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Neurobiologia do medo

Quando um animal é exposto a uma situação de perigo, como por exemplo uma presa diante de seu predador, o conjunto de alterações fisiológica e comportamentais da presa diante dessa situação é chamada de resposta tipo medo. Evolutivamente, essa resposta tem como objetivo aumentar as chances de sobrevivência, quer seja evitando contato direto com o predador, através do comportamento de congelamento, ou no caso de contato com ele, lutar ou fugir (MISSLIN, 2003; BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; MADDOX et al., 2019).

Seyfarth, Cheney e Marler, (1980), mostraram que macacos da espécie *Chlorocebus pygerythrus* exibem diferentes comportamentos com base no estímulo aversivo apresentado. Quando expostos a um perigo eminente no chão, como a presença de um predador, tal qual um leopardo, seu comportamento é subir em árvores a fim de dificultar o acesso do predador a eles. Se o estímulo aversivo vier do alto, a exemplo de uma águia, os macacos alteram seu comportamento buscando abrigos mais próximos do chão e evitando as copas. Todos esses comportamentos são reproduzidos por outros indivíduos presentes, devido aos sons de alerta emitidos pelo bando para identificar qual tipo de predador está sendo visto.

A resposta tipo medo em animais pode ser adquirido experienciando uma situação como no caso de macacos que tiveram contato com o predador e conseguiram sobreviver ao ataque, e devido a isso, foi possível utilizar a mesma estratégia para sobreviver aos próximos ataques ou até mesmo evitá-los. Outra forma de conhecer situações que geram comportamentos tipo medo é através da observação de algum coespecífico que teve contato com um evento modulador desse comportamento, como por exemplo a presença de algum predador. Na literatura, o primeiro é chamado de medo condicionado ao contexto onde um estímulo pode evocar uma resposta defensiva e o segundo, de medo condicionado a observação, sendo ambos utilizados em estudos que

visam entender os comportamentos defensivos frente a um estímulo aversivo (WALTERS; CAREW; KANDEL, 1981); COOK et al., 1985)

Dentre os estudos com o medo condicionado por observação, associados ao medo condicionado ao contexto, Pisansky e colaboradores (2017) mostraram que ao colocar um rato em uma gaiola transparente, emitir um ruído por um aparelho, e logo em seguida aplicar um choque no animal, modelo esse caracterizado como o medo condicionado ao contexto, este animal irá exibir comportamento defensivo. Ao mesmo tempo, ao ser colocado um outro rato em uma gaiola transparente em frente ao primeiro, este último por observação, exibiu o comportamento de medo após o ruído, mesmo não sendo aplicado o choque.

A fim de entender como o cérebro processa informações que podem desencadear o medo, estudos do século anterior, como o de Chapman *et al.*, (1954), Goddard, (1964) e Horvath, (1963) mostraram a AMIG como o centro modulador de comportamentos tipo medo. No entanto, sabe-se hoje que apesar desta estrutura ser a principal nos mamíferos, muitas outras influenciam na resposta fisiológica e comportamental do medo. Dentre elas tem-se: o HYP, HP, regiões corticais, PAG, L.C., NP, NRCP, núcleo motor dorsal do vago (NMDV), núcleo leito da estria terminal (NLET) (STEIMER, 2002; FOX et al., 2015; GHAEMI KERAHRODI; MICHAL, 2020).

Somado a isso, a região do tronco encefálico (TE) é responsável pela recepção e envio desse processamento que irá regular tanto respostas fisiológicas, quanto comportamentais, de sensopercepção e formação de memórias do tipo aversivas (MADDOX et al., 2019). Como resultado, atualmente é possível entender melhor tanto as bases neurobiológicas do medo, quanto os comportamentos associados e suas modulações através de fármacos.

Fanselow e Pennington, (2018) relataram além dos crescentes estudos envolvendo o medo e sua neurobiologia, a importância em estudá-los em diferentes espécies a fim de compreender melhor os mecanismos em cada uma delas.

Dos variados estudos publicados, na tentativa de observar a neurobiologia da memória do tipo aversiva e do comportamento de medo, foi observado em mamíferos que quando um indivíduo é exposto a uma situação de perigo, a ABL recebe projeções de áreas encefálicas como o HYP e córtex associativo. A ABL então irá ativar neurônios glutamatérgicos desta para o núcleo central da amígdala (CeA) e para o Córtex Pré-frontal (CPF) (BOCCHIO; NABAVI; CAPOGNA, 2017; DUVARCI; PARE, 2014; MCNALLY; JOHANSEN; BLAIR, 2011; MOTTA; CAROBREZ; CANTERAS, 2017; SANDERS; WILTGEN; FANSELOW, 2003; YANG et al., 2021) (Figura 2). Apesar da ABL ser o primeiro local de processamento, é no CeA onde os sinais serão integrados e então enviados para áreas como: HP, PAG, LC, NP, NRCP, NLET e NMDV. Essas últimas irão enviar projeções para o TE, onde a resposta final irá modular a fisiologia e comportamento do indivíduo (STEIMER, 2002; LEE; LEE; KIM, 2016)

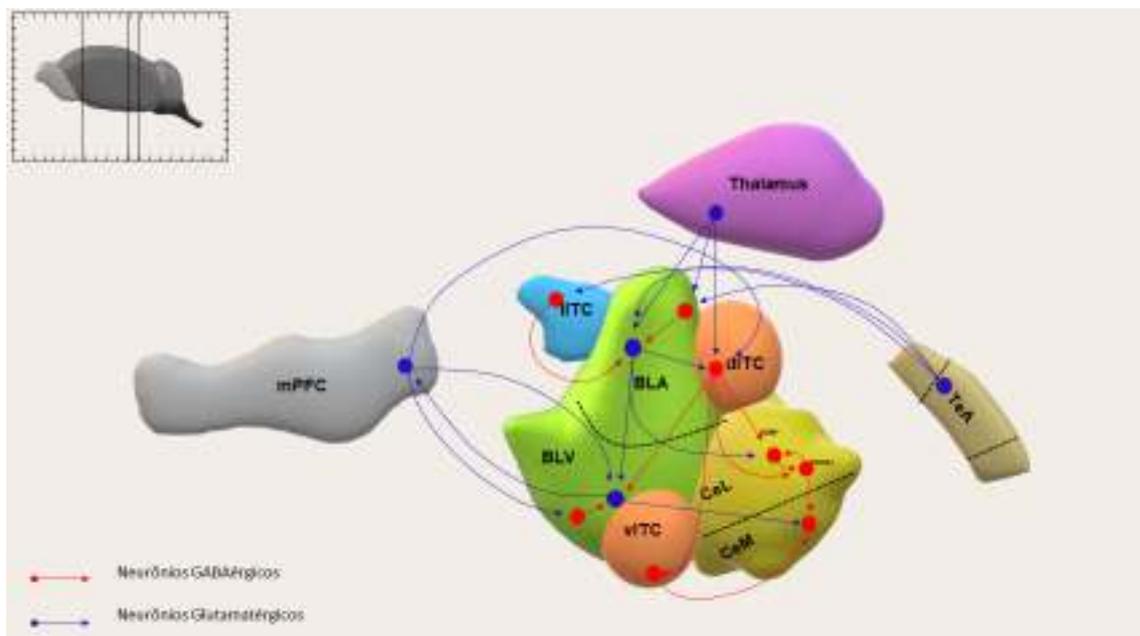


Figura 1: Processamento de informações de aspectos aversivos que resultam na resposta de medo. A informação chega à amígdala basolateral através da ligação com o hipotálamo e com córtex associativo. A partir disso, projeções glutamatérgicas e gabaérgicas serão direcionadas a vários locais alvo modulando a informação. ABL, amígdala basolateral; BLV, Amígdala ventrolateral; CeL, núcleo lateral da amígdala; CeM, núcleo medial da amígdala; diTC, células intercaladas dorsais; viTC, células intercaladas ventrais; ilTC, células intercaladas laterais; mPFC, córtex pré-frontal medial; TeA, córtex associativo; SOM+, neurônios somatostatina positivos; PKC δ +, neurônios que possuem proteína quinase C delta-positivo. Adaptado de LEE; LEE; KIM, (2016).

Um trabalho publicado por Adolphs *et al.*, (1994) com uma paciente humana que veio a ser conhecida como SM, mostra o papel da AMÍG em processos importantes relacionados ao medo. A paciente SM de 30 anos era acometida pela doença de Urbach-Wiethe, que deposita grandes quantidades de minerais nos tecidos amigdalóides, degenerando estes. Com a perda da amígdala, funções importantes como reconhecer expressões de medo em diferentes faces foi prejudicado, alterando assim toda a circuitaria citada anteriormente.

Estudando outras espécies, como por exemplo ratos machos adultos da linhagem *Sprague dawley*, durante a exposição a um estímulo aversivo, como a um predador, o circuito descrito, pode desencadear ainda a formação de memória do tipo aversiva, e isso é visto a nível molecular, temporal, e neuronal (SCHAFE; DOYÈRE; LEDOUX, 2005).

Frente a uma situação de perigo, áreas como o córtex entorrinal (CE), córtex associativo, córtex visual, córtex auditivo, irão enviar informações para a AMÍG e HP, que irão verificar a natureza de cada informação obtida e associá-las. No caso de uma presa frente a um predador, uma memória do tipo aversiva poderá ser formada unindo a informação sobre o predador, e o comportamento adotado. Os neurônios do HP irão liberar glutamato dos terminais pré-sinápticos para a fenda sináptica, e esse glutamato poderá se ligar a receptores N-metil D-aspartato (NMDA) localizados no terminal pós sináptico de um outro neurônio. Devido a essa ligação, canais de Cálcio serão abertos permitindo assim o influxo de Cálcio (Ca^{++}) para dentro do neurônio, onde irá ativar proteínas quinases e adenilato ciclase, envolvidas na fosforilação de proteínas e produção de Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPc) respectivamente. Devido a atividade dessas proteínas, poderá ser solicitado ao neurônio a produção de genes de expressão imediata como *c-fos* e *zif-268*. Esses genes ao saírem do núcleo celular, serão enviados aos ribossomos onde serão traduzidos em proteínas como a c-Fos e Zif-268. A primeira é expressa em áreas cerebrais onde há atividade daquela região em diversos processos incluindo a formação de memória, enquanto a segunda está envolvida durante o processo de plasticidade sináptica que é definida como a capacidade do neurônio sofrer

modificações devido a sua atividade, sendo essas modificações: aumento da arborização dendrítica, aumento no número de vesículas liberadas, aumento na produção de proteínas envolvidas com a transmissão sináptica. (LEE; LEE; KIM, 2016; SANDERS; WILTGEN; FANSELOW, 2003; WEI et al., 2002; TISCHMEYER; GRIMM, 1999; PASCUAL-LEONE et al., 2005).

Conforme a presa é exposta, cada vez mais a situações de perigo, em que há a detecção do predador ou sinais de sua presença, conseqüentemente será desencadeando os processos neurais supracitados, que culminarão na expressão de comportamentos que irão auxiliar na luta ou fuga do animal. Nesse sentido, comportamentos defensivos tipo medo poderão ser expressos de maneira mais rápida a cada contato com o predador ou o contexto (WIEDENMAYER, 2009).

3.2 Evolução do sistema nervoso e homologias telencefálicas em lagartos

Como mencionado inicialmente, a AMIG é um dos principais centros moduladores de aprendizagem emocional tipo o medo. Procurar entender onde essa e outras áreas estão localizadas em outros grupos evolutivos, se torna importante para: 1) aumentar o conhecimento dentro daquele grupo sobre a forma e função de áreas cerebrais envolvidas com a sobrevivência do indivíduo a perigos, e 2) estudos de formação e manutenção de aprendizagem dentro da própria espécie (ABEL; LATTAL, 2001; LABERGE et al., 2006; GUPTA et al., 2012).

O cérebro de cada grupo evolutivo de vertebrados como peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, varia em forma, tamanho e função de áreas. A teoria clássica a respeito do cérebro diz que, quanto mais derivado o grupo, o cérebro se torna mais complexo e especializado em forma e funções (KAPPERS; HUBER; CROSBY, 1937; PAPEZ, 1929).

Dos grupos mencionados é possível observar que com o aumento do tamanho cerebral nos mais derivados, novos centros de processamentos foram formados, assim como novos tipos neuronais. Isso implicou além de um

aumento na complexidade comportamental do grupo, as vias de processamento das informações do ambiente foram aprimoradas, visto que partindo dos peixes onde seu ciclo vital se restringe a água, e os mamíferos à terra, as informações provindas desses ambientes são distintas (NORTHCUTT, 2002).

Como exemplo de área, o cerebelo (CB), como apresentado na revisão de Strick, Dum e Fiez (2009), é uma área importante que integra as informações vindas de áreas motoras e cognitivas. Esta é observada em todos os grupos de vertebrados, e tendo em vista a evolução do cérebro, é mostrado que nos grupos mais derivados como as aves e mamíferos, há uma expansão dessa área, sugerindo uma maior atividade na integralização das informações (NORTHCUTT, 2002).

Quando estudadas as áreas telencefálicas de diferentes espécies, o número de grupos celulares aumenta conforme são estudadas espécies mais derivadas. Em peixes lampreias, Nieuwenhuys (1977), observou que este número se restringiu a 6 grupos. Nieuwenhuys, ten Donkelaar e Nicholson (1998), ao estudarem a salamandra tigre, uma espécie de anfíbio, observaram 11 tipos. Halpern, Karten e Hodos (1968), na espécie de pombo doméstico, observaram que este número se elevou para 33, e por fim, Paxinos e Watson (2006), conforme observado em seu atlas com uma espécie de roedor, possui 66 grupos, o dobro do encontrado em aves.

Quanto a função de áreas em diferentes grupos, nos peixes há uma área denominada *pallium*, com ênfase na sub-região nomeada zona medial da área telencefálica dorsal, e esta pode estar modulando processos como os de memória nesses animais, (SALAS et al., 2006); VARGAS; LÓPEZ; PORTAVELLA, 2009). Estrutura para função semelhante é encontrada em mamíferos quando se observa estudos com o hipocampo.

O grupo dos anfíbios por sua vez, segundo Sotelo *et al.*, (2017) possui o *pallium* medial para função semelhante, visto que foi identificado neurônios ativos nessa área durante uma tarefa de memória espacial. González e López (2002), identificaram que as conexões existentes entre o núcleo septal medial

e o núcleo da banda diagonal em uma espécie de anuro, é semelhante a via colinérgica septohipocampal existente em mamíferos.

Em aves, Barnea e Pravosudov (2011) em sua revisão apontam que na região posterior do *hiperpallium* desse grupo, há uma região que é semelhante ao HP em mamíferos, quer seja em função e estrutura.

Répteis como lagartos da espécie *Tropidurus hispidus*, possuem sub-regiões do telencéfalo como o CM, CDM, e CD, homólogas ao HP em mamíferos, e que apresentam envolvimento no aprendizado de tarefas de medo ou espaciais (SANTOS, 2018; SANTOS, 2016).

Em relação aos répteis, diante da necessidade em se ter estudos aprofundados em diversas áreas, dentre elas a neurobiologia do medo, algumas espécies como a *Tropidurus hispidus* já foi utilizada em trabalhos que vão desde sua distribuição geográfica, alimentação, endoparasitose, comportamentos defensivos e sociais. Além disso, há um aumento de trabalhos que envolvem a formação e manutenção de memória, sejam elas espaciais, visuais ou aversivas conforme visto na literatura (MACÊDO-LIMA, 2013; SANTOS, 2018; SANTOS 2016; ABAYARATHNA; WEBB, 2020; REITER et al., 2017; LADAGE et al., 2012) FOÀ et al., 2009; LEAL; POWELL, 2012). Isso faz desse grupo um bom modelo para ser utilizado em pesquisas que visam o aprofundamento das áreas supracitadas.

É sabido que o telencéfalo reptiliano é composto por áreas como: CM, CDM e CD que se comportam como o HP (Figura 3), visto que sob algum tipo de injúria dessas áreas, a capacidade de formar memórias ou evoca-las é prejudicada (SANTOS, 2018; DAY; CREWS; WILCZYNSKI, 2001). Dados como esses são corroborados com estudos histoquímicos onde sugerem que o CM dos répteis se assemelha ao giro denteado (GD) de mamíferos, onde são observadas projeções de zinco do CM para o CDM, semelhante ao que ocorre com as fibras musgosas no HP de mamíferos da região do Giro do Corno de Ammon 3 (CA3) (LACEY, 1978; NAUMANN et al., 2015; LAURENT et al., 2016). O CD em répteis é sugerido como equivalente as regiões do Giro do Corno de Ammon 1 (CA1) e Giro do Corno de Ammon 2 (CA2) em

mamíferos (DAVIES et al., 2002; LANUZA et al., 1997; LOPEZ-GARCIA et al., 2002).

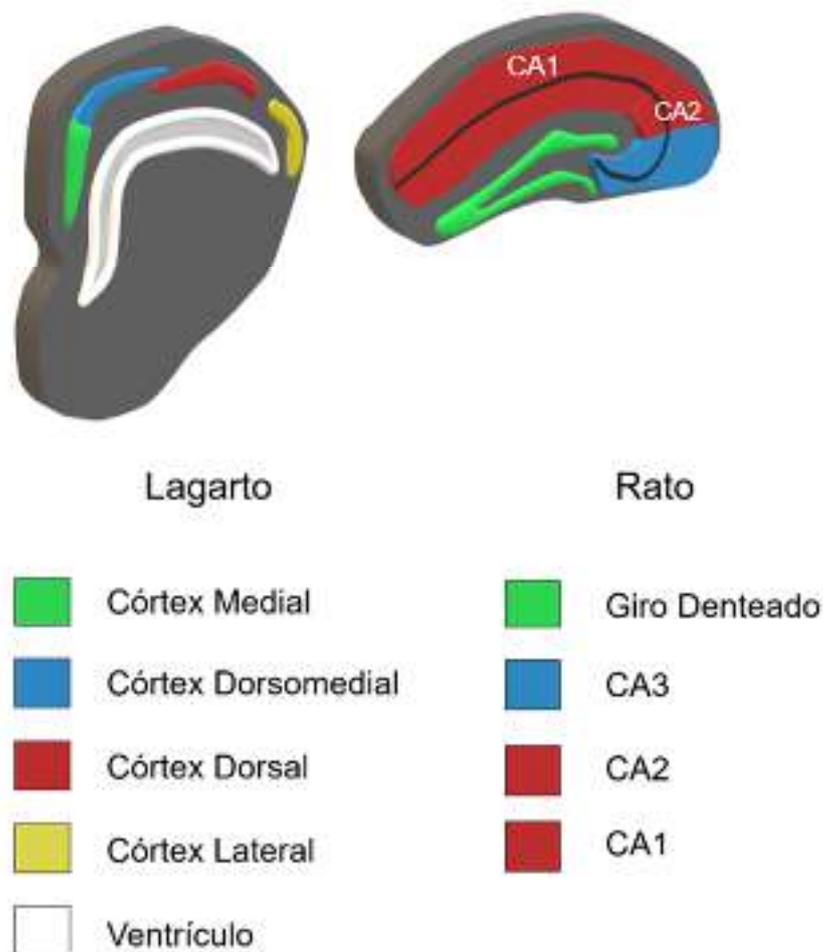


Figura 2: Homologia hipocampal entre lagartos (répteis) e ratos (mamíferos). Adaptado de MACÊDO-LIMA, 2013

Luzzati, (2015), diferente dos estudos anteriores para o CD de répteis, infere que essa área pode ser considerada semelhante ao Neocórtex (NCX) de mamíferos, devido a proteína doublecortina (CDX) revelar que neurônios recém formados no CD de lagartos são semelhantes aos encontrados nas camadas mais internas do NCX de mamíferos.

Além das áreas hipocampais citadas em répteis, envolvidas em processos de memória, outras não-hipocampais e relacionadas ao perigo também são sugeridas. A AMÍG em mamíferos descrita como principal modulador, é sugerido que seu padrão de conexões e tipos celulares, se assemelham a RDVP, o NAL, e a ADL em lagartos, (LANUZA, 1998). Outras áreas como o CL em lagartos da espécie *Podarcis hispânica*, foi mostrado por Martinez-Garcia *et al.*, (1986) que pode ser considerado cômpar ao CE de mamíferos, visto que no lagarto esta região recebe projeções do bulbo olfatório (BO), e envia projeções para regiões hipocampais como o CD.

O estriado na espécie de lagarto *Gecko gecko*, foi mostrado por Gonzalez, Russchen e Loliman (1990) que pode ser considerado como o NCX em mamíferos, visto que além de receber projeções de muitas áreas motoras e cognitivas, também envia projeções para essas áreas, mostrando um processamento maior das informações nessas regiões.

Além de estudos comparativos entre répteis e mamíferos, busca-se entender as correlações cerebrais entre répteis e outros grupos como o das aves. Briscoe e Ragsdale (2018), baseados em estudos anteriores, tanto de expressão gênica, como de desenvolvimento embrionário, propuseram que o CM dos lepidossauros (grupo onde se encontram os lagartos) possui expressão gênica e células neuronais similares ao HP medial das aves, que fazem parte do grupo dos arcossauros. Isso denota que tanto o CM de lagartos quanto o HP de aves podem ser estudados a fim de observar se possuem também a mesma função.

Estudos em outros grupos evolutivos como os já mencionados, contribuem para o entendimento de como essas áreas podem ser correlacionadas com áreas de outros grupos, e em situações diversas, como por exemplo frente a um predador (MEDEIROS, 2019; SAINT-DIZIER *et al.*, 2009; SANTOS, 2010; ZANETTE *et al.*, 2019).

Na tentativa de entender como uma área cerebral atua em situações de perigo pode-se: 1) inibir ou ativar esta e avaliar o comportamento animal e 2) avaliação da ativação de genes de expressão imediata. O primeiro tem o

objetivo de sugerir se determinada área participa na expressão de algum comportamento tipo medo, ou de processos mentais relacionados a este. Santos (2018), através de um protocolo de avaliação de comportamento aversivo, observou que lagartos da espécie *Tropidurus hispidus* que tiveram o CD inibido por um agonista GABAérgico, apresentaram comportamento semelhante aos animais controles que não tiveram essa área inibida. Além disso esse ensaio sugere que essa mesma área possui papel nas fases de aquisição, consolidação e evocação de memória, visto que estas foram prejudicadas no grupo que teve a área inibida, quando comparado a seu controle.

Para estudos que visam a participação de genes de expressão imediata, Santos (2016) sob o mesmo protocolo e espécie, observou que a proteína Zif-268 (produto da transcrição do gene *zif-268*) foi encontrada em níveis elevados no HP e AMIG desses animais após apresentarem comportamento tipo medo. Essa proteína participa do processo de plasticidade sináptica frente a um evento comportamental ou cognitivo.

De maneira ampla, os genes de expressão imediata são utilizados na literatura porque seus produtos de expressão servem como indicadores de atividade neural e plasticidade (SAUVAGE; KITSUKAWA; ATUCHA, 2019; SIQUEIRA et al., 2019), sendo o gene *zif-268* já mencionado para plasticidade, e o gene *c-fos* envolvido na atividade neural. Devido ao foco deste trabalho envolver a proteína c-Fos, será discutido mais aprofundado no próximo tópico o uso desta como marcador.

3.2.1 c-Fos como marcador de atividade neuronal

Uma das vantagens em se utilizar os genes de expressão imediata é que tanto seu tempo de expressão quanto de seus produtos, as proteínas, são bem estabelecidos na literatura. A exemplo disso é a expressão de c-fos, com seu pico gênico entre 20 e 40 minutos, enquanto a proteína produto de sua expressão se dá entre 1 a 2 horas após o estímulo, tendo seu pico de expressão em até 2 horas (ZANGENEHPOUR; CHAUDHURI, 2002; FARIVAR; ZANGENEHPOUR; CHAUDHURI, 2004).

Filipkowski *et al.*, (2000) utilizando a marcação para o produto da expressão do gene *c-fos*, observou que ratos *Wistar* quando tem suas vibrissas estimuladas quer seja por manipulação do pesquisador ou durante um protocolo de exploração de ambiente, a atividade do córtex somatossensorial é aumentada em até duas horas depois do evento, quando comparado a seu grupo controle.

Siqueira *et al.*, (2019), utilizando a espécie de lagarto *Tropidurus hygomi*, puderam observar que quando animais focais eram expostos em momentos distintos a machos, fêmeas ou juvenis da mesma espécie, diferentes áreas cerebrais como o CM, CDM e a AMIG, tiveram um aumento da imunorreatividade de c-Fos, que juntamente a dados comportamentais sugerem uma possível correlação entre o comportamento social e as áreas encefálicas envolvidas.

Logo, uma das muitas vantagens em se utilizar a marcação para c-Fos é que além desta marcar núcleo de neurônios, o que promove uma maior delimitação e identificação de cada neurônio, ela possibilita a indicação de quais áreas estão ativas no momento em que um comportamento tipo medo é evocado frente a um estímulo aversivo. Além do mais, uma área ativa pode enviar projeções para outra área inativando-a, e isso também contribuir para a mesma resposta à um estímulo aversivo. Sabendo disso, é importante o aprofundamento de estudos nessas e em outras regiões para entender como diferentes áreas em conjunto auxiliam nessa tarefa (JAWORSKI; KALITA; KNAPSKA, 2018).

Um dos trabalhos onde foi observado um aumento de c-fos nos estágios iniciais de um comportamento é o de Nikolaev, Werka e Kaczmarek (1992), onde foi visto que a expressão de *c-fos* em ratos é maior nas fases iniciais deste, quando comparadas a fase posterior onde o animal desempenha melhores resultados nas tarefas.

Quanto ao mecanismo molecular que leva a ativação da proteína c-Fos e em quais alvos esta irá atuar, é estabelecido na literatura que após um indivíduo ser submetido a um estímulo, esse sinal será modulado e guiado para dentro do neurônio. Este então será conduzido por segundos mensageiros,

com íons de cálcio (CA⁺⁺), ou pelo aumento da atividade da adenilato ciclase (AC), ou pela atividade da via MAPK/ERK. (JAWORSKI; KALITA; KNAPSKA, 2018; WANG et al., 2018)

Independente de qual via o sinal percorrer, ao final de cada uma delas um fator de transcrição denominado CREB, localizado no núcleo do neurônio será ativado. O CREB irá se ligar a uma unidade denominada CRE que por fim irá ativar a sequência gênica *c-fos* que será traduzida na proteína c-Fos. (LUKASIUK; KACZMAREK, 1994)

Até o presente momento a descrição feita compreende do período em que o indivíduo recebeu o estímulo e este foi processado por alguma área encefálica correlacionada a codificação deste. Devido a isso, o gene *c-fos* é conhecido como gene de expressão imediata.

O produto final da expressão do gene *c-fos* é um ótimo marcador para atividade neural. No citoplasma do neurônio, a proteína c-Fos tem um papel envolvido na expressão de outros genes, como os que podem gerar plasticidade, a exemplo do *zif-268*. Isso se dá porque a c-Fos irá se ligar a outras proteínas da família C-Jun, formando o complexo proteína de ativação 1 (AP-1). Esse complexo será enviado ao núcleo para ativar regiões gênicas que quando traduzidas, formarão proteínas como a *Zif-268* e a *Arc*, sendo essas importantes para a plasticidade do neurônio e para a geração de novas sinapses respectivamente (COUNTRYMAN et al., 2005; FARIVAR; ZANGENEHPOUR; CHAUDHURI, 2004; GALLO et al., 2018; GANDOLFI et al., 2017; JAWORSKI; KALITA; KNAPSKA, 2018; LIN et al., 2018; LUKASIUK; KACZMAREK, 1994; WANG et al., 2018)

Apesar dos ensaios acima citados, é evidenciado por Santos (2018), Santos (2016) e Striedter (2016), que a escassez de trabalhos com o grupo dos répteis de forma geral dificulta a compreensão em detalhes do sistema nervoso, dentre eles processos mnemônicos. Além disso, a aplicação de diferentes ferramentas de estudo e procedimentos metodológicos dificulta o esclarecimento de como áreas encefálicas se correlacionam com diferentes comportamentos, a exemplo do estudo de revisão proposto por Luzzati, (2015)

onde sugere que o CD dos lagartos possui semelhança as camadas mais internas do NCX de mamíferos, enquanto Davies *et al.*, (2002); Lanuza *et al.*, (1997); Lopez-Garcia *et al.*, (2002), sugerem que a mesma área reptiliana pode apresentar mesma semelhança com as subdivisões CA1 e CA2 do HP de mamíferos.

3.2.2 *Tropidurus hispidus* como modelo animal para pesquisas em neurociência

Na tentativa de alcançar novos modelos experimentais que possam ser replicados por outros grupos de pesquisa, e o interesse em utilizar espécies de grupos evolutivos diferentes, a espécie de lagarto *T.hispidus* (Figura 3) vem sendo utilizada cada vez mais em trabalhos científicos com a temática envolvendo comportamento, memória, estrutura encefálica e imunorreatividade de proteínas produtos de genes de expressão imediata (Santos, 2016; Santos 2018; Pimentel *et al.*, 2014; Santos, 2010; Medeiros, 2019).



Figura 3: *Tropidurus hispidus* (SPIX, 1825). Fonte: Retirado de Santos (2016).

Dentre as características que fazem dessa espécie um bom modelo experimental, podem ser mencionadas: 1) distribuição geográfica; 2) forrageamento e dieta; 3) organização cerebral; 4) comportamento frente a situações aversivas.

Quanto a distribuição geográfica, de acordo com o *The reptile database* (2021) essa espécie pode ser encontrada na Venezuela, Ilha Margarida, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, e no Brasil nos estados da Bahia, Pará,

Amazonas, Ceará, Sergipe, Piauí, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Paraíba e Rio de Janeiro.

O tipo de forrageamento não só dessa espécie mas da família *Tropiduridae* em geral, e até o momento observado, se restringe ao tipo senta-e-espera (RIBEIRO, 2010; HUEY; PIANKA, 1981). Isso reflete em uma nutrição baseada em alimentos que cruzem o campo de visão deste como insetos, principalmente formigas e larvas de besouros coleópteros (VITT; ZANI; CALDWELL, 1996). Um ponto a ser ressaltado sobre esse tipo de forrageamento é que lagartos contidos nesse modelo são considerados como tendo os órgãos quimiorreceptores pouco desenvolvidos e tendo a visão como principal órgão de percepção (COOPER, 1995).

O cérebro de lagartos da espécie *T. hispidus* seguem o padrão dos Squamatas em geral, e algumas das áreas as serem destacadas são: CM, CDM, CD, CL, AMIG, Núcleo esférico (NE), estriado (ESTR), Septo (SEPT), Região Ventricular Dorsal Anterior (RVDA), RVDP, ATSA, além de 3 camadas celulares, sendo elas divididas em: Plexiforme Interna (PI), Plexiforme externa (PE), e camada celular. (PIMENTEL, H.C et al., 2011). Para o estudo citado, além das regiões que compõe o cérebro, foram observados os tipos celulares, totalizando 10 tipos, com ressalva para os neurônios piramidais localizados no CM, fato esse utilizado para análises de comparação com diferentes grupos, tal qual região do CM se assemelha ao GD em mamíferos como já citado anteriormente no texto.

Na literatura, apesar de escassos, os estudos que trabalham comportamento do tipo aversivo nessa espécie e processos correlacionados, ajudam como pontos de partida para questões que podem ser aprofundadas em estudos posteriores com a mesma temática ou adaptados. Dos estudos até então realizados, o primeiro a propor um modelo para testar o comportamento tipo medo, e sua correlação de como a memória pode ser modulada perante isso, foi realizado por Santos (2016). Nele, os lagartos da espécie *T. hispidus* foram divididos em dois grupos: grupo controle que foi exposto a uma gaiola vazia, e grupo estímulo aversivo, exposto a uma gaiola contendo um gato doméstico (*Felis catus*) dentro. Baseado em parâmetros comportamentais

como tempo de congelamento, número de entrada em quadrantes, número de deslocamento iniciados, latência para o primeiro movimento, e número de tentativas de fuga, foi possível estabelecer que expor o animal a um gato doméstico gera respostas comportamentais do tipo aversivas, quando comparadas a animais que foram expostos somente a uma gaiola vazia.

Partindo desse estudo, Santos (2018), utilizando o mesmo protocolo, investigou se o CD teria papel importante na expressão de comportamento tipo medo nesses animais, e para isso foi utilizado um agonista GABAérgico a fim de silenciar a área. Ao final do ensaio foi possível observar que esta área não é necessária para a expressão do comportamento tipo medo, visto que os animais que tiveram suas regiões bloqueadas, ainda assim demonstraram expressão comportamental frente à gaiola contendo um gato dentro. No entanto essa área possui participação nas fases de aquisição, consolidação e evocação de memória do tipo aversiva.

Medeiros (2019), avaliou, indiretamente, a ação do óxido nítrico (NO), molécula gasosa que dentre tantos processos participa também da neurotransmissão, crescimento axonal, e diferenciação celular, no processo de modulação do comportamento do tipo medo em lagartos da espécie já mencionada. Além disso, foi verificado se houve interferência glutamatérgica nos neurônios nitrérgicos após exposição a um gato doméstico. Para isso o experimento foi dividido em duas etapas, onde na primeira, os animais foram submetidos ao protocolo de exposição ao gato, e após 24 horas foram eutanasiados e através da técnica histoquímica para NADPH-diaforase, os neurônios produtores de NO foram marcados, e avaliado o padrão de distribuição destes no cérebro dos animais. Na segunda etapa, foi injetado no cérebro dos animais o Ácido D(-)-2-amino-5-fosfopentanóico (AP5), antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, em doses variadas a fim de observar alterações no comportamento do tipo medo nos lagartos, e após 24 horas, os animais foram decapitados, e repetido o processo anterior para a técnica histoquímica. Como um dos resultados desse estudo, foi possível observar que quando aplicado o AP5, a depender da dose, o animal pode sofrer um efeito ansiolítico e explorar mais o ambiente mesmo que na

presença do gato, evidenciando assim que a via glutamatérgica-óxido nítrico tem papel importante na modulação do comportamento de medo nos animais dessa espécie. Além disso foi possível observar que a liberação de NO no NAL, CD, ADL, ESTR, RVDA, está envolvida na modulação do comportamento de medo no *T.hispidus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O experimento foi realizado segundo as normas éticas do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Sergipe (CEPA-UFS) sob protocolo 26/2016 (Anexo I) em acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca), do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, que segue as recomendações feitas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Laboratório de Neurofisiologia (LNFS) e o Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva (LaNCE) possui também a devida autorização para captura e experimentação com finalidade científica do animal silvestre *Tropidurus hispidus*, emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) sob o protocolo ICMBio/SISBio de número 5857-5.

4.2 Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados 18 lagartos adultos machos da espécie *Tropidurus hispidus*, medindo entre 60-120 mm (medida rostro-cloaca). Essas medidas são baseadas na literatura onde considera adulto, lagartos que possuem as medidas citadas (ALBUQUERQUE et al., 2018).

Os animais foram capturados nos arredores da Universidade Federal de Sergipe (Campus São Cristóvão) sob as coordenadas de GPS 10°55'13.4"S 37°06'31.1"W, e utilizando-se de vara com laço na ponta. Os animais coletados

pesavam entre 30 e 40 gramas, e após a captura foram mantidos em terrários (aquário de vidro com 0,8m x 0,6m x 0,5m, comprimento, largura, altura) (Figura 4), em no máximo 6 animais por terrário, e tiveram livre acesso a água, durante os dias que permaneceram no laboratório. A comida foi dada (larvas da espécie de coleóptero *Tenebrio molitor*) uma vez por dia até o dia de perfusão. O assoalho do terrário foi composto por uma camada de 5 cm de cascalho fino e areia lavada onde os animais puderam se enterrar durante a noite, e uma lâmpada de calor acima deles acoplada a um timer respeitando seu ciclo circadiano natural de 10/14h. As lâmpadas eram ligadas às 10:00 am e eram desligadas as 06:00 pm.

Para a realização do experimento, foi utilizado também um gato doméstico (*Felis catus*), fêmea, castrada, pesando 3.5kg e com idade de 3 anos.

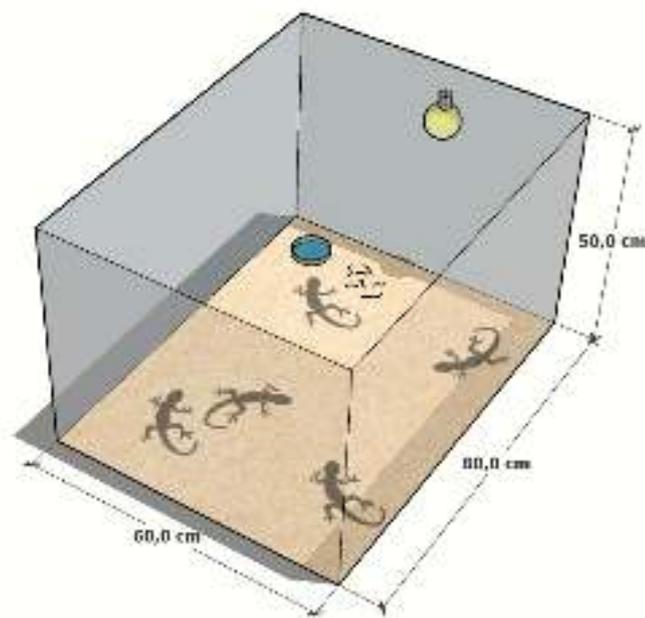


Figura 4: Terrário de acomodação para o lagarto *Tropidurus hispidus*. Fonte: Arquivo pessoal

4.3 Delineamento experimental

Esse estudo foi desenvolvido em duas etapas: 1) Teste comportamental expondo o lagarto *Tropidurus hispidus* a um gato doméstico (*Felis catus*), a fim de avaliar parâmetros comportamentais como resposta a essa exposição e 2) Imunohistoquímica para a proteína c-Fos, com o intuito de observar áreas do telencéfalo do lagarto possivelmente envolvidas após a exposição.

Os 18 animais foram distribuídos nos seguintes grupos: Estímulo Neutro (n=6), Estímulo Aversivo (n=6), e grupo Controle Total (n=6). O grupo Estímulo Neutro (EN) foi composto pelos animais que foram submetidos a uma gaiola vazia. O grupo Estímulo Aversivo (EA) por animais que foram expostos a uma gaiola contendo um gato doméstico dentro, e por fim o grupo controle (CTR) corresponde aos animais que não passaram por nenhuma exposição. Os únicos procedimentos experimentais realizados neste último grupo foram a extração do cérebro e a etapa imunohistoquímica, a fim de comparar o número de células ativadas com os demais grupos.

Para realização do teste comportamental foi utilizado um campo aberto quadrado medindo 80x80x60cm (comprimento, largura e altura). Primeiramente os animais, separadamente, foram colocados no campo aberto para um período de habituação de 10 minutos (Figura 5.A) onde puderam realizar livre exploração. Em seguida, ocorreu o período de exposição, também de 10 minutos e livre exploração, onde os animais do EN foram expostos a uma gaiola vazia e o grupo EA a uma gaiola contendo um gato doméstico dentro (Figura 5.B e 5.C respectivamente). Este campo aberto foi isolado por cortinas fixas para que o animal não tivesse visão de qualquer elemento da sala de experimentação, evitando assim possíveis vieses.

Após esse período, os animais foram colocados individualmente em caixas (50x30x30 de comprimento, largura e altura) onde permaneceram por 90 minutos até serem perfundidos. Esse tempo é o descrito na literatura necessário para o pico de expressão da proteína c-Fos (entre 90-120 minutos) após um estímulo (ZANGENEHPOUR; CHAUDHURI, 2002; SIQUEIRA et al., 2019).

É importante ressaltar que havia duas gaiolas, uma para o EN, e outra para o EA, sendo ambas esterilizadas com álcool a 70% após cada sessão a fim de eliminar qualquer possível pista olfativa do cenário anterior. A etapa comportamental foi desenvolvida entre 11:00 am e 05:00 pm, respeitando o horário de atividade desses animais na natureza.

Além disso, durante as etapas comportamentais, os animais eram observados através de um monitor na sala ao lado, de forma que os lagartos só tiveram contato com o pesquisador em dois momentos, quando foram colocados no campo aberto e no momento em que a gaiola vazia ou contendo um gato dentro foi adicionada após os 10 primeiros minutos.

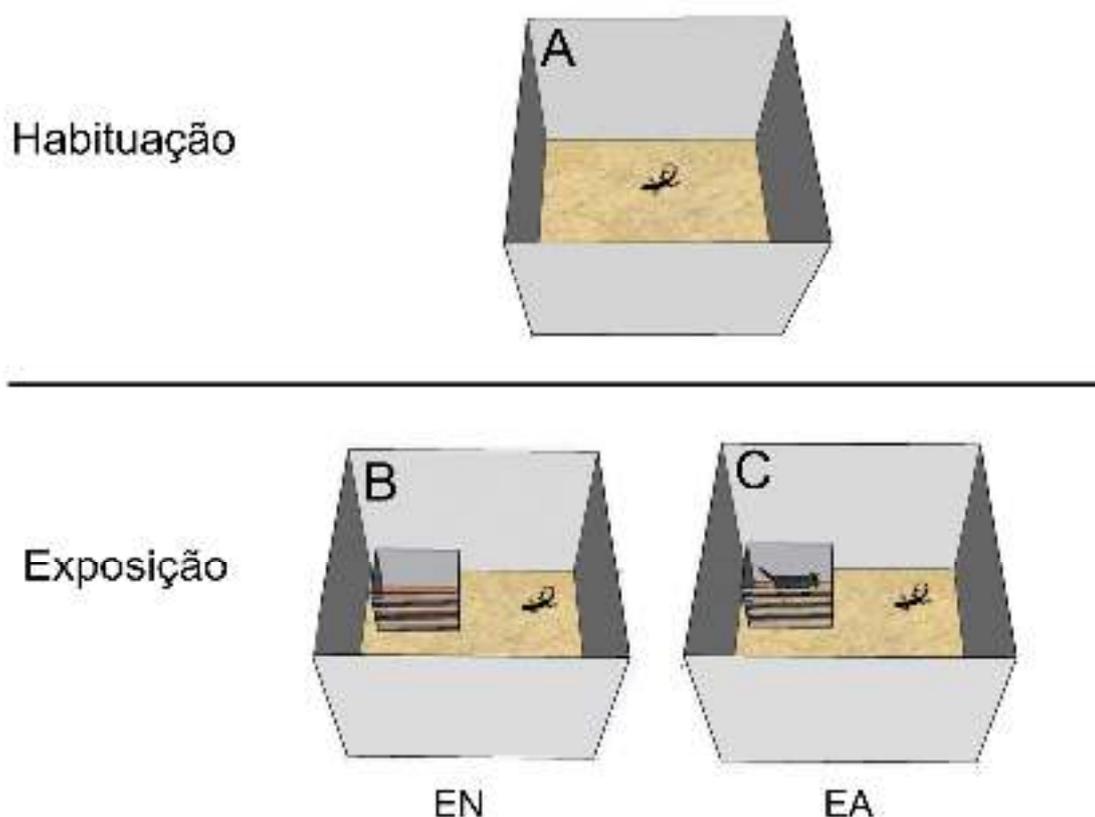


Figura 5: Modelo para avaliar memória aversiva. A) Fase de habituação, onde os animais Estímulo Neutro (EN) e Estímulo Aversivo (EA) permaneceram por 10 minutos. B) Fase de exposição, onde os animais do Estímulo Neutro (EN) foram expostos por 10 minutos a uma gaiola vazia, e B) os animais do Estímulo Aversivo (EA) foram expostos por 10 minutos a uma gaiola contendo um gato doméstico dentro. Fonte: Arquivo pessoal.

4.3.1 Preparo das amostras

Posteriormente à realização dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com 10 mg/kg de xilazina e 100 mg/kg de quetamina via intraperitoneal. Após estarem sob efeito da anestesia, foi dado início a perfusão intracardíaca com paraformaldeído (PFA) 4%. Para isso, cada lagarto foi inicialmente imobilizado e em seguida realizado uma toracotomia mediana para exposição do coração. Foi feita então a introdução de uma agulha no ápice do coração, acompanhada de uma perfuração do átrio direito. Foi injetado pela agulha durante 5 minutos uma solução tampão fosfato salina (PBS) a 0,1 M, e em seguida durante 15 minutos uma solução de paraformaldeído 4% (PFA) 0,1 M e pH 7,4. Em seguida os cérebros foram removidos por craniotomia, pós-fixados a 4° C, por 24 horas no mesmo fixador (PFA 4%), e foram armazenados em sacarose 30%, também a 4°C. Os cérebros fixados foram seccionados em criostato de deslizamento (Leica, USA), no plano coronal a uma espessura de 50 µm.

Após esse procedimento, os cortes histológicos foram submetidos ao processo de imunohistoquímica para observar a marcação de c-Fos.

4.3.2 Descarte de material biológico

Após o procedimento de perfusão, o material biológico não utilizado foi colocado em sacos plásticos próprio para esse tipo de descarte e enviado para o freezer do biotério setorial, localizado no Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe.

As seringas, agulhas e materiais perfurocortantes, utilizados durante a perfusão, foram descartados em caixas de papelão próprias também para esse descarte. Essas caixas foram isoladas e armazenadas até o recolhimento por uma empresa especializada.

4.3.3 Imunorreatividade para a proteína c-Fos

Os cortes histológicos de cada animal foram lavados 4 vezes (durante 5 minutos cada) com tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4, sob agitação automática, e logo após foram pré-tratadas com peróxido de hidrogênio a 0,3% em PB por 20 minutos para inativação da peroxidase endógena e novamente passaram por 4 lavagens (5 minutos cada) em PB. Os cortes foram então colocados por 15 minutos em um tampão bloqueador (TB) composto de leite desnatado 5% em PB 0,1M, e foi feita uma lavagem com PB, sem agitar. Em seguida, as secções foram incubadas a 25°C em overnight (de 18 a 24 horas) em um anticorpo primário produzidos anti-rato (1:250; Oncogene Science, Cambridge) diluído em PB contendo Triton-X 100 (ICN Biomedicals) a 0,4% e 2% de soro de cabra (Sigma Chemical Company) a 2% do animal em que foi obtido o anticorpo secundário. Após uma nova bateria de 4 lavagens em PB, as secções foram colocadas em contato por 120 minutos com o anticorpo secundário biotilado (*goat anti-mouse*), na concentração de 1:200 (Jackson), diluído em uma solução de TritonX 100 a 0,4% em PB 0,1 M. Logo em seguida, os cortes passaram novamente por uma bateria de 4 lavagens em PB e foram incubados numa solução de AvidinaBiotina-Peroxidase a 2% (Vectastain Standard ABC kit, Vector Labs, USA; 2% da solução total), contendo 0.4% de Triton-X 100 NaCl, por 120 minutos, e foram lavados novamente 4 vezes em PB. Para revelar a reação, os cortes foram colocados em contato por 4 minutos com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St Louis, MO, USA) a 2,5%, diluída em PB (0,1M / pH 7,4). Então foram realizadas 4 lavagens dos tecidos (5 minutos cada) com PB a 0,1 M e pH 7,4. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secas em temperatura ambiente e posteriormente mergulhadas em uma solução de tetróxido de ósmio a 0,05%, por 30 segundos, para intensificação da reação.

4.3.4 Aquisição e análise das imagens

Foram analisadas 5 imagens de cada área e para cada animal, totalizando 40 imagens por animal. Estas foram digitalizadas por meio de um microscópio óptico (Olympus, BX-41) com lente objetiva de 20x de aumento com uma câmera acoplada (Nikon, DMX – 1200) e conectada a um computador. Foi quantificado o número de neurônios c-Fos positivos para as seguintes áreas: CM, CDM, CD, CL, AMIG, RVDP, ESTR e SEPT.

4.3.5 Análise de dados

Todos os testes comportamentais foram filmados e os parâmetros quantificados por um software de rastreamento animal (Any-maze, Stoelting, EUA). Os dados obtidos foram processados e analisados pelo software estatístico Prism 8.0 (Graphpad Software Inc, EUA).

Para a contagem de células foi utilizado o programa *ImageJ* (versão 1.53.E), e feita a contagem manual por um dos integrantes do laboratório que não teve acesso as informações de qual animal pertencia as imagens em questão, evitando assim um possível viés.

Os dados comportamentais e de contagem de células foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e somente o segundo apresentou distribuição paramétrica.

Para os testes comportamentais foram avaliados os seguintes parâmetros: distância percorrida, tempo de imobilidade, latência para o primeiro deslocamento, latência para o primeiro movimento e número de quadrantes visitados.

A latência para o primeiro deslocamento, refere-se ao tempo que o animal levou para se deslocar de um ponto a outro do aparto, não possuindo uma distância mínima para isso. A latência para o primeiro movimento refere-se ao tempo que o animal levou para fazer qualquer movimento dentro do aparato, quer seja mover a cabeça ou a cauda.

O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar os dados do mesmo grupo tanto na habituação, quanto na exposição. O teste de Mann-Whitney foi

utilizado para comparar os dados dos diferentes grupos na habituação ou na exposição.

Para os dados de contagem de células, foram computados neurônios que apresentaram marcação para a proteína c-Fos. Esses dados foram analisados por uma ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey. Além disso foi aplicado o teste de correlação de Pearson para avaliar se houve correlação no número de células c-Fos positivas entre diferentes áreas do cérebro dos animais.

Os dados comportamentais foram expressos como medianas e intervalos interquartis (Q1 e Q3), enquanto dos dados de contagem de célula foram expressos como média e erro padrão da média. Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Além disso foi utilizado o programa *Gephy* (The Gephi Consortium v.0.9.2) para representar graficamente as correlações obtidas pelo Prism. A vantagem em se utilizar esse programa é a utilização de um algoritmo computacional chamado *Atlas Force 2* no qual o pesquisador insere dados de origem, alvo, e peso cada área cerebral que apresentou correlação com outra área. Após isso é criado um grafo de nós e arestas para melhor entendimento dessas correlações, facilitando o entendimento dos dados para o pesquisador.

5 RESULTADOS

5.1 Teste comportamental: exposição do lagarto *T. hispidus* a um estímulo aversivo.

Para a distância percorrida (Figura 6), o teste de Mann Whitney não evidenciou diferença significativa entre o grupo EN e EA durante a habituação ($U=16,00$; $p=0,3939$; Mediana EN= 5,62m; Q3= 5,92 – Q1= 5,15; Mediana, EA= 6,34m; Q3= 10,93m – Q1= 5,05m), contudo durante a exposição ($U=6,00$; $p= 0,0303$) o grupo EA apresentou uma distância percorrida menor (Mediana

EA= 0,00m; Q3= 0,00m – Q1= 0,00m) quando comparado ao EN (Mediana EN =0,10m; Q3= 0,32m – Q1= 0,01m).

No teste de Wilcoxon foi observado que o grupo EN apresentou uma distância percorrida menor durante a exposição a gaiola vazia (Mediana EN= 0,10m; Q3= 0,32m – Q1= 0,01m) do que na habituação (Mediana EN= 5,62m; Q3= 5,92m – Q1= 5,15m) ($W=-21,00$; $p= 0,0156$). Para o grupo EA foi observado mesma diferença que o grupo EN na fase de exposição (Mediana EA= 0,00m; Q3= 0,00m – Q1= 0,00m) quando comparada a fase de habituação (Mediana EA= 6,34m; Q3= 10,93 – Q1= 5,05) ($W=-21,00$; $p= 0,0156$).

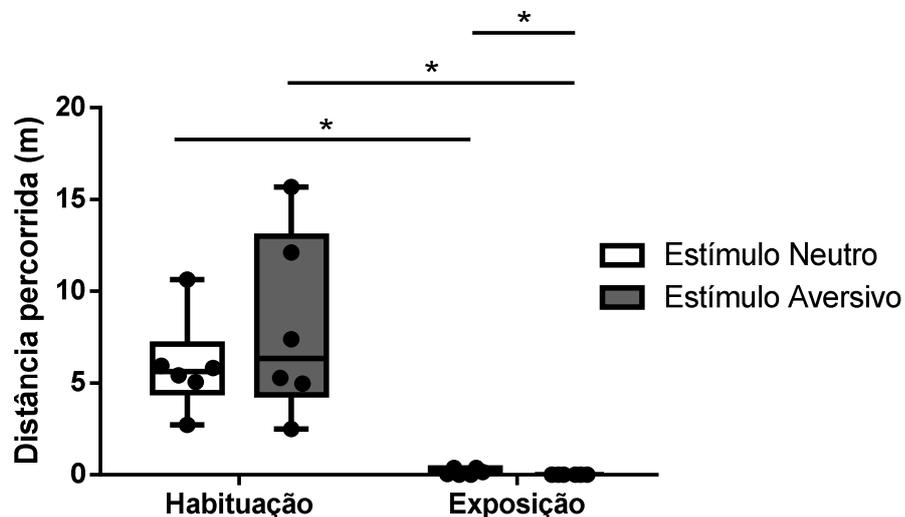


Figura 6: Distância percorrida pelos animais do grupo Estímulo Neutro (EN), e Estímulo Aversivo (EA), nas fases habituação e exposição. Os dados são expressos como mediana e intervalos interquartis. Foram utilizados os testes de Wilcoxon (para medidas repetidas) e Mann-Whitney e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

Quanto ao tempo de imobilidade (Figura 7), o teste de Mann Whitney mostrou que os animais do grupo EA passaram mais tempo imóveis quando comparado ao grupo EN ($U=3,00$; $p=0,0076$) durante a exposição (Mediana EN= 591s ; Q3=596,60s - Q1=585,93s; Mediana EA= 600s ; Q3=600s - Q1=600s), diferença essa não observada para os mesmos grupos durante a habituação ($U=9,00$; $p=0,0898$; Mediana EN= 487,6s ; Q3=514,15s - Q1=460,08s; Mediana EA =429,1s ; Q3=478,85s - Q1=358,48s).

O teste de Wilcoxon mostrou um aumento significativo desse parâmetro no grupo EA quando comparadas as fases de habituação (Mediana=429,1s ; Q3=478,85s - Q1=358,48s) e exposição (Mediana=600s; Q3=600s - Q1=600s) ($W=21,00$; $p=0,0313$), diferença essa também observada no grupo EN para as mesmas fases (Mediana da habituação=487,6s; Q3=514,15s - Q1=460,08s; Mediana da exposição=591s; Q3=596,60s - Q1=585,93s) ($W=21,00$; $p=0,0156$).

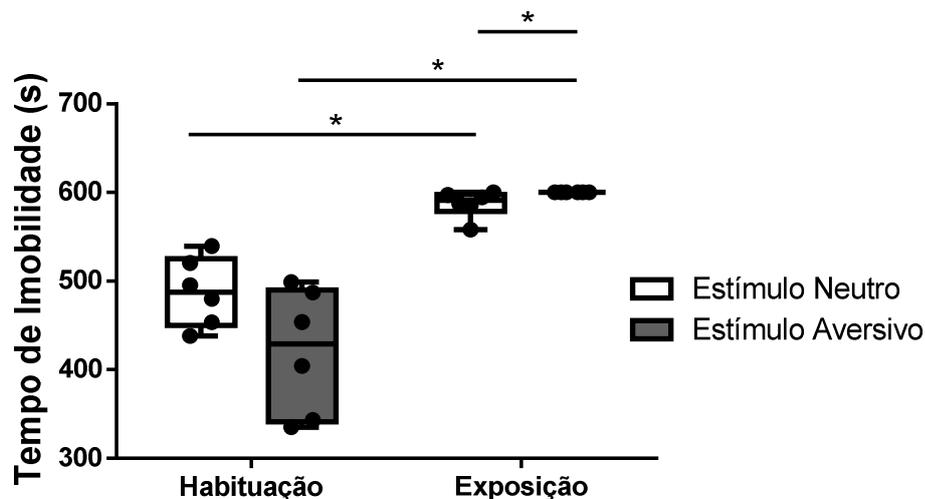


Figura 7: Tempo de imobilidade apresentado pelos animais do grupo Estímulo Neutro (EN) e Estímulo Aversivo (EA), nas fases habituação e exposição. Os dados são expressos como mediana e intervalos interquartis. Foram utilizados os testes de Wilcoxon (para medidas repetidas) e Mann-Whitney, e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

A latência para o primeiro deslocamento (Figura 8) contabiliza o tempo que os animais levaram para se locomover pela primeira vez no aparato, ressaltando que o movimento de cabeça não foi contabilizado. Quando os grupos foram analisados separadamente, o teste de Wilcoxon mostrou que o grupo EA levou mais tempo para realizar o primeiro deslocamento na fase de exposição (Mediana=600s; Q3=600s - Q1=600s), quando comparado a fase de habituação (Mediana=70,50s; Q3=109,50s - Q1=59,25s) ($W=21,00$; $p=0,0156$). Da mesma forma foi observado um aumento significativo no grupo EN na fase de exposição (Mediana=502s; Q3=575,50s - Q1=353,50s), quando comparado a habituação (Mediana=138s; Q3=194,50s - Q1=94,25s) ($W=21,00$; $p=0,0156$).

Aplicado o teste de Mann Whitney, este não mostrou diferença no grupo EN e EA ($U=8,00s$; $p=0,0660$) na etapa de habituação (Mediana EN=138s; $Q3=194,50s$ – $Q1=94,25s$; Mediana EA=70,50s; $Q3=109,50s$ – $Q1=59,25s$), contudo quando analisados na etapa de exposição, os dados mostraram que o grupo exposto ao gato levou mais tempo para realizar o primeiro deslocamento (Mediana=600s; $Q3=600s$ – $Q1=600s$) quando comparado ao grupo exposto a gaiola vazia (Mediana=502s; $Q3=575,50s$ – $Q1=353,50s$) ($U=3,00$; $p=0,0076$).

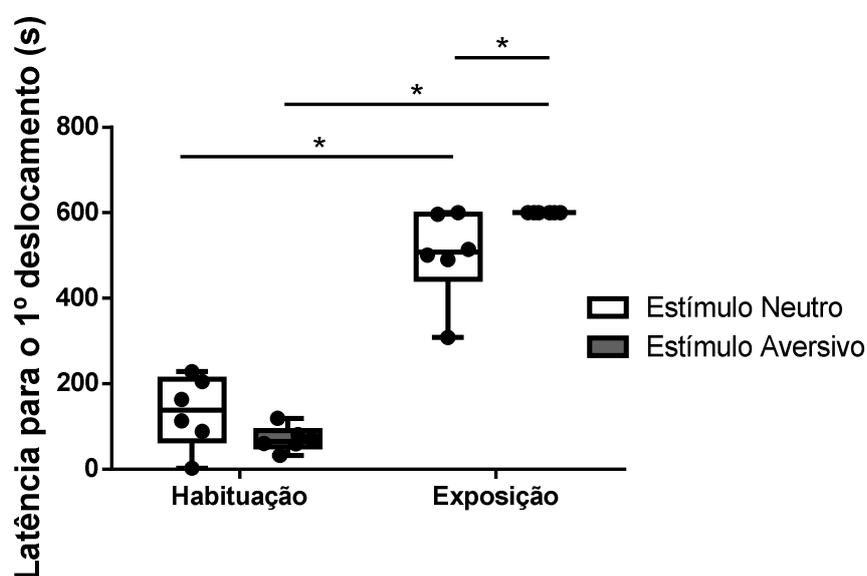


Figura 8: Latência para o primeiro deslocamento realizado pelos animais do grupo Estímulo Neutro (EN) e Estímulo Aversivo (EA), nas fases habituação e exposição. Os dados são expressos como mediana e intervalos interquartis. Foram utilizados os testes de Wilcoxon (para medidas repetidas) e Mann-Whitney e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

A latência para o primeiro movimento (Figura 9) ao ser analisada pelo teste de Mann Whitney, não apresentou diferença entre o grupo EA e o EN na fase de exposição ($U=14,00$; $p=0,2771$; Mediana EN= 333s ; $Q3= 474,25s$ - $Q1= 110,75s$; Mediana EA= 86s ; $Q3= 476,75s$ - $Q1= 58,00s$), contudo na fase de habituação foi visto um aumento significativo desse parâmetro no grupo EN quando comparado com o grupo EA ($U=6,00$ $p=0,0325$; Mediana EN= 135s; $Q3=190s$ – $Q1= 89,00s$; Mediana EA= 60s; $Q3= 63,75s$ – $Q1= 25,25s$). O teste de Wilcoxon não apresentou diferença no grupo EA quando comparado a habituação (Mediana=60s $Q3=63,75s$ - $Q1=25,25s$) com a exposição

(Mediana= 86s; Q3= 476,75s - Q1= 58,00s; W=12,00s p=0,1215). Contudo para o grupo EN foi observado diferença estatística significativa, mostrando um aumento desse parâmetro na exposição (Mediana= 333s; Q3= 474,25s - Q1= 110,75s) quando comparado a habituação (Mediana = 135s; Q3= 190s - Q1= 89,00s; W=17,00; p=0,0469).

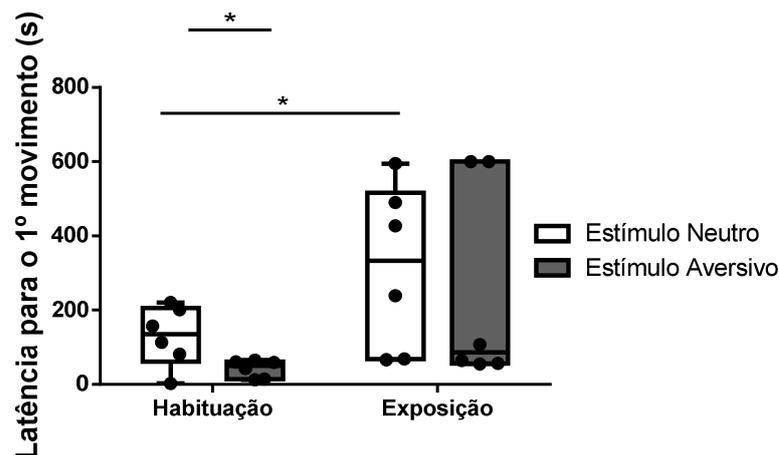


Figura 9: Latência para o primeiro movimento realizado pelos animais do grupo Estímulo Neutro (EN) e Estímulo Aversivo (EA), nas fases habituação e exposição. Os dados são expressos como mediana e intervalos interquartis. Foram utilizados os testes de Wilcoxon (para medidas repetidas) e Mann-Whitney e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

No número total de quadrantes visitados (Figura 10), o teste de Wilcoxon apresentou diferença significativa ($W = -21,0$; $p = 0,0156$) para o grupo EN quando comparadas as etapas habituação (Mediana= 8; Q3= 9,75 - Q1= 7,00) e exposição (Mediana= 1; Q3= 1 - Q1= 1), mesma diferença vista no grupo EA para as mesmas etapas (Mediana= 12,5; Q3= 19 - Q1= 9,75; Mediana= 1; Q3= 1 - Q1= 1; $W = -21$, $p = 0,0156$), mostrando que o número de quadrantes visitados durante a exposição em ambos os grupos, foi menor quando comparado ao período de habituação. O teste de Mann Whitney por sua vez, não apresentou diferença estatística ($U = 10,50$, $p = 0,1288$) quando comparado ambos os grupos na etapa habituação (Mediana EN= 8; Q3= 7 - Q1= 9,75; Mediana EA= 12,5; Q3= 19 - Q1= 9,75) e na etapa exposição ($U = 15,00$, $p = 0,5000$; Mediana EN= 1; Q3= 1 - Q1= 1; Mediana EA= 1; Q3= 1 - Q1= 1), mostrando que apesar dos animais terem entrado em um número menor de quadrante durante a exposição, isso foi visto em comum para ambos os grupos.

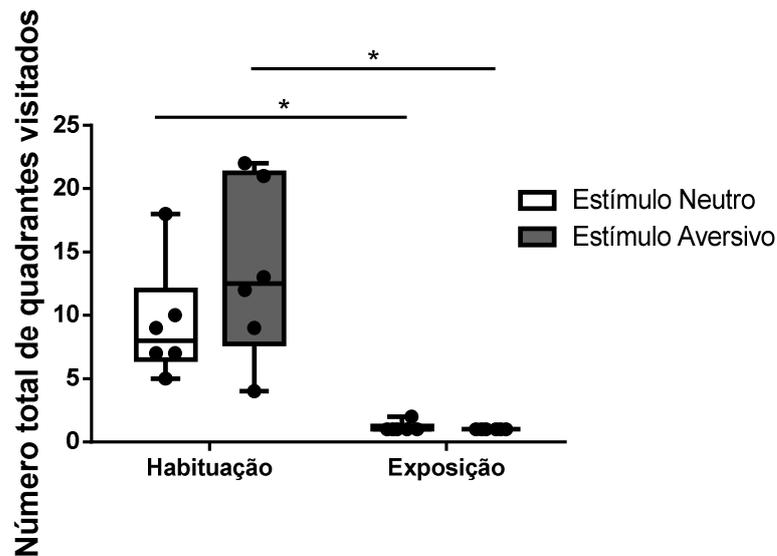


Figura 10: Número total de quadrantes visitados pelos animais tanto do grupo Estímulo Neutro, quanto Estímulo Aversivo, nas fases habituação e exposição. Os dados são expressos como mediana e intervalos interquartis. Foram utilizados os testes de Wilcoxon (para medidas repetidas) e Mann-Whitney e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5.2 Marcação de neuronios c-Fos positivos em diferentes áreas telencefálicas em resposta a exposição a um estímulo neutro ou aversivo.

Para o CM, a ANOVA de uma via mostrou diferença ($p = 0,0281$) entre os grupos analisados e o teste de múltiplas comparações de Tukey mostrou que houve um aumento de células c-Fos positivas somente no grupo EA, quando comparado ao grupo CTR ($p = 0,0304$) (Figura 11.A).

No CDM a ANOVA de uma via apresentou diferença entre os grupos analisados ($p = 0,0009$), e o pós teste de múltiplas comparações de Tukey mostrou que houve um aumento de células c-Fos positivas quando comparado o grupo EA ao grupo CTR ($p = 0,0007$) e ao grupo EN ($p = 0,0306$) (Figura 11.B).

Para o CD a ANOVA de uma via não apresentou diferença estatística ($p = 0,0507$) entre os grupos quanto ao número de células c-Fos positivas (Figura 11.C).

O CL apresentou diferença estatística pela ANOVA de uma via ($p = 0,0143$) nos grupos analisados, e o pós-teste de Tukey mostrou que houve um

aumento de células c-Fos positivas no grupo EA quando comparado ao CTR ($p = 0,0130$) (Figura 11.D).

As áreas acima citadas compõem as regiões hipocâmpais do lagarto e podem ser vistas através de imagens representativas na Figura 12.

Para a RVDP, a ANOVA de uma via mostrou diferença estatística ($p < 0,0001$) nos grupos analisados, e o pós-teste de Tukey mostrou um aumento de células c-Fos positivas no grupo EA quando comparado ao grupo CTR ($p < 0,0001$) e EN ($p = 0,0006$). Houve também um aumento quando comparado o grupo EN com o CTR ($p = 0,0181$) (Figura 11.E).

Para a AMIG a ANOVA de uma via mostrou diferença estatística ($p < 0,0001$) nos grupos analisados, e o pós-teste de Tukey evidenciou um aumento de células c-Fos positiva no grupo EA quando comparado ao grupo CTR ($p < 0,0001$) e ao grupo EN ($p = 0,0005$) (Figura 11.F).

No ESTR a ANOVA de uma via mostrou diferença estatística ($p = 0,0073$) entre nos grupos analisados, e o teste de Tukey evidenciou um aumento de células c-Fos positivas no grupo EA quando comparado com o grupo CTR ($p = 0,0069$), e comparando o grupo EN ao CTR ($p = 0,0466$) (Figura 11.G)

Para esta última área, que é o SEPT, a ANOVA mostrou diferença estatística significativa ($p > 0,0001$), e o teste de Tukey apontou que essa diferença é baseada na comparação do grupo EA com o grupo CTR ($p < 0,0001$) e do grupo estímulo aversivo com o grupo estímulo neutro ($p = 0,0020$). No entanto assim como os anteriores, essa diferença não foi vista ao comparar o grupo estímulo neutro e seu controle ($p = 0,0735$) (Figura 11.H).

Diferente das áreas hipocâmpais citadas inicialmente, as do presente momento se referem às não hipocâmpais e podem ser visualizadas de forma representativa na Figura 13.

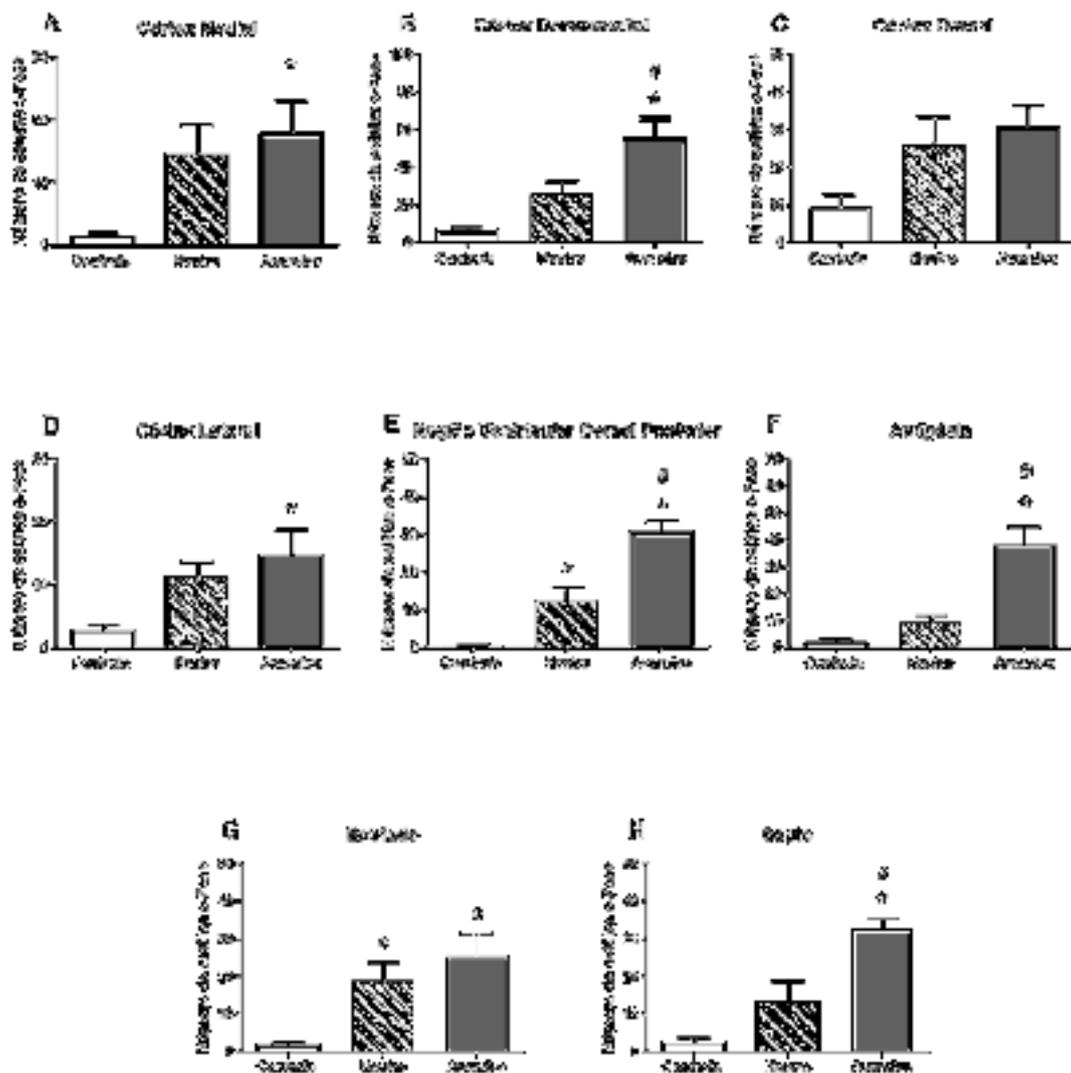


Figura 11: Número de células c-Fos positivas em diferentes áreas do córtex do lagarto *Tropicurus hispidus* após submetido ao protocolo de estímulo aversivo. Essas áreas são: **A)** Córtex medial; **B)** Córtex Dorsomedial; **C)** Córtex Dorsal; **D)** Córtex Lateral; **E)** Região Ventricular Dorsal Posterior; **F)** Amígdala; **G)** Estriado; **H)** Septo. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. Foi utilizado ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey. Sinalizados estão os grupos em que foi observado diferença em relação ao grupo CTR (*), e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

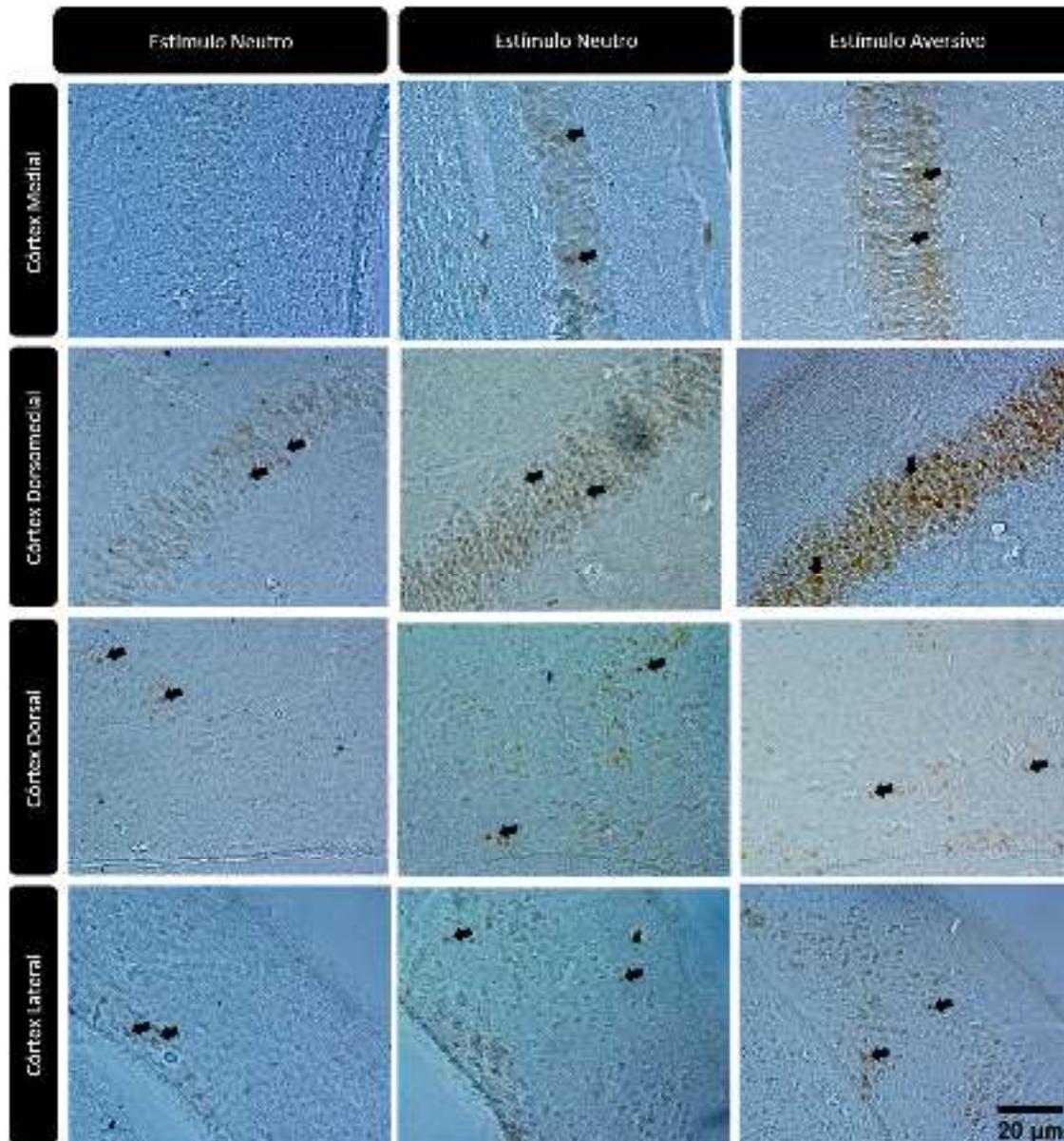


Figura 12: Imagens representativas das áreas hipocâmpais do lagarto *Tropidurus hispidus* após exposição ao protocolo de estímulo aversivo. As áreas representadas são: Córtex Medial, Córtex Dorsomedial, Córtex Dorsal e Córtex Lateral.

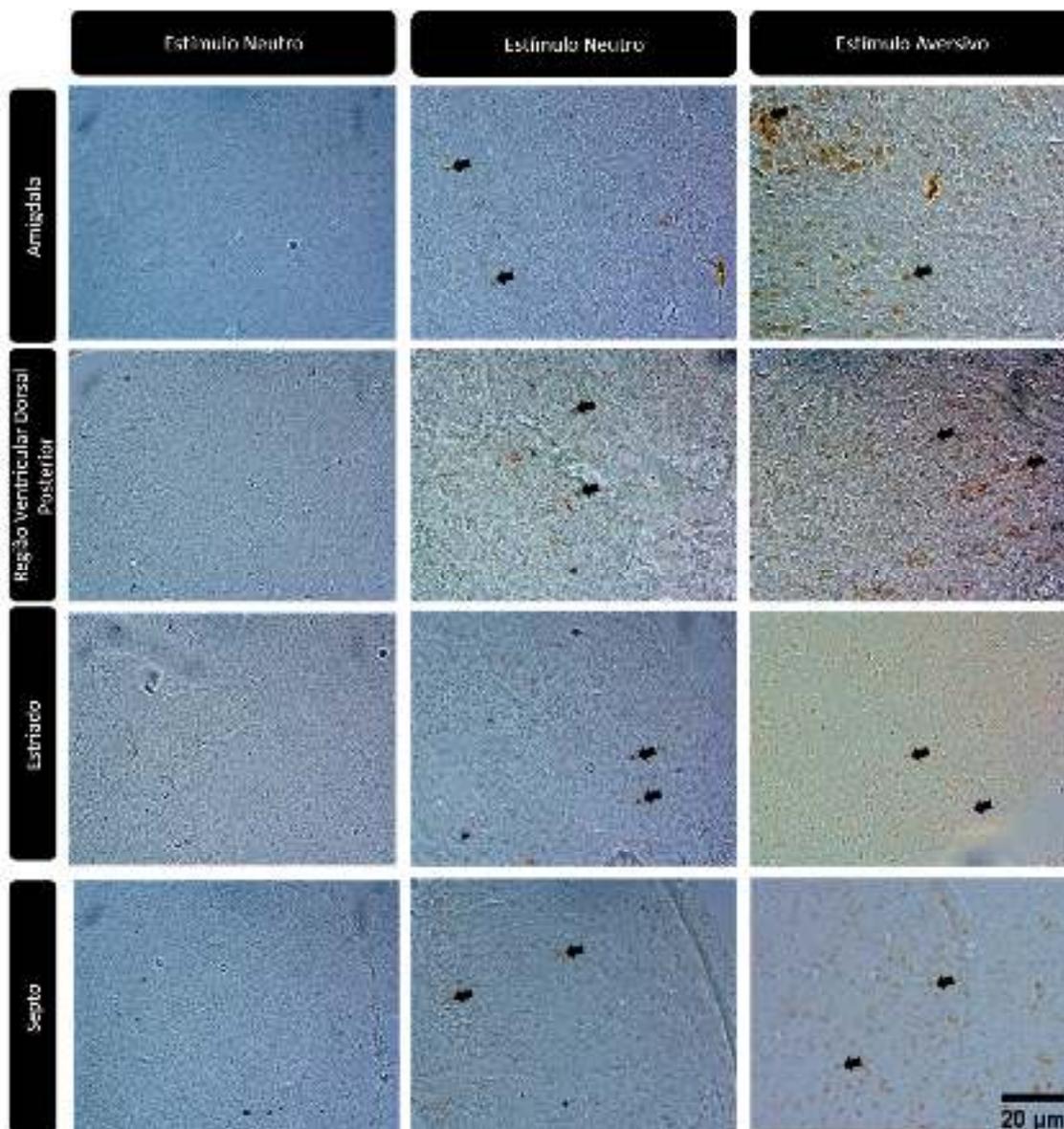


Figura 13: Imagens representativas das áreas hipocâmpais do lagarto *Tropidurus hispidus* após exposição ao protocolo de estímulo aversivo. As áreas em questão são: Amígdala, Região Ventricular Dorsal Posterior, Estriado e Septo. Foi realizada Imunohistoquímica para a proteína c-Fos e as setas pretas indicam neurônios que apresentaram essa proteína.

5.3 Correlação entre áreas telencefálicas do lagarto *Tropidurus hispidus* após exposição a um estímulo aversivo ou neutro

Segundo o teste de correlação de Pearson, o CM possui correspondência significativa e positiva apenas com o ESTR ($p= 0,0056$ $r= 0,7417$), (Figura 14.A).

O córtex CDM, pelo teste de correlação de Pearson apresentou correspondência significativa e positiva com o CD ($p= 0,0056$ $r= 0,7464$) (Figura 14.B), AMIG ($p=0,0028$ $r= 0,8173$) (Figura 14.C).

Para o CD foi encontrado uma correlação significativa e positiva, pelo teste de correlação de Pearson, com o CL ($p= 0,0056$ $r= 0,7376$) (Figura 14. D) e ESTR ($p=0,0028$ $r= 0,8566$) (Figura 14. E)

O teste de correlação de Pearson mostrou correlação significativa e positiva entre o CL e ESTR ($p= 0,0028$ $r= 0,8701$) (Figura 14.F).

A AMIG mostrou correlação significativa e positiva através do teste de Pearson com RVDP ($p= 0,0028$ $r= 0,8302$) (Figura 14.G) e SEPT ($p= 0,0028$ $r= 0,8921$) (Figura 14.H).

Quando aplicado o teste de correlação de Pearson para a RVDP, foi visto uma correlação significativa e positiva com o SEPT ($p= 0,0028$ $r= 0,8107$) (Figura 14.I) e com o CDM ($p= 0,0028$ $r= 0,7565$) (Figura 14.J).

O SEPT, através do teste de correlação de Pearson, mostrou correlação positiva e significativa com o CDM ($p=0,0028$ $r= 0,7565$) (Figura 14.L) e ESTR ($p= 0,0140$ $r= 0,7091$) (Figura 14.K).

A última área analisada, o ESTR, através do teste de correlação de Pearson, apresentou correlação significativa e positiva com o AMIG ($p= 0,0028$ $r= 0,8026$) (Figura 14.M) e com o CDM ($p= 0,0056$ $r= 0,7421$) (Figura 14.N).

Por fim foi possível observar um resumo da relação entre todas as áreas através de um grafo produzido pelo *Gephy* (Figura 15). Esse programa apresenta um *layout* das correlações observadas ao longo desse estudo. Para isso foi necessário apresentar os dados de entrada, que são as áreas de origem, os dados de saída, que são para onde a primeira área está ativando projeções, e o peso entre esses parâmetros, que já foi definido no Prism se essas mesmas áreas possuem correlações.

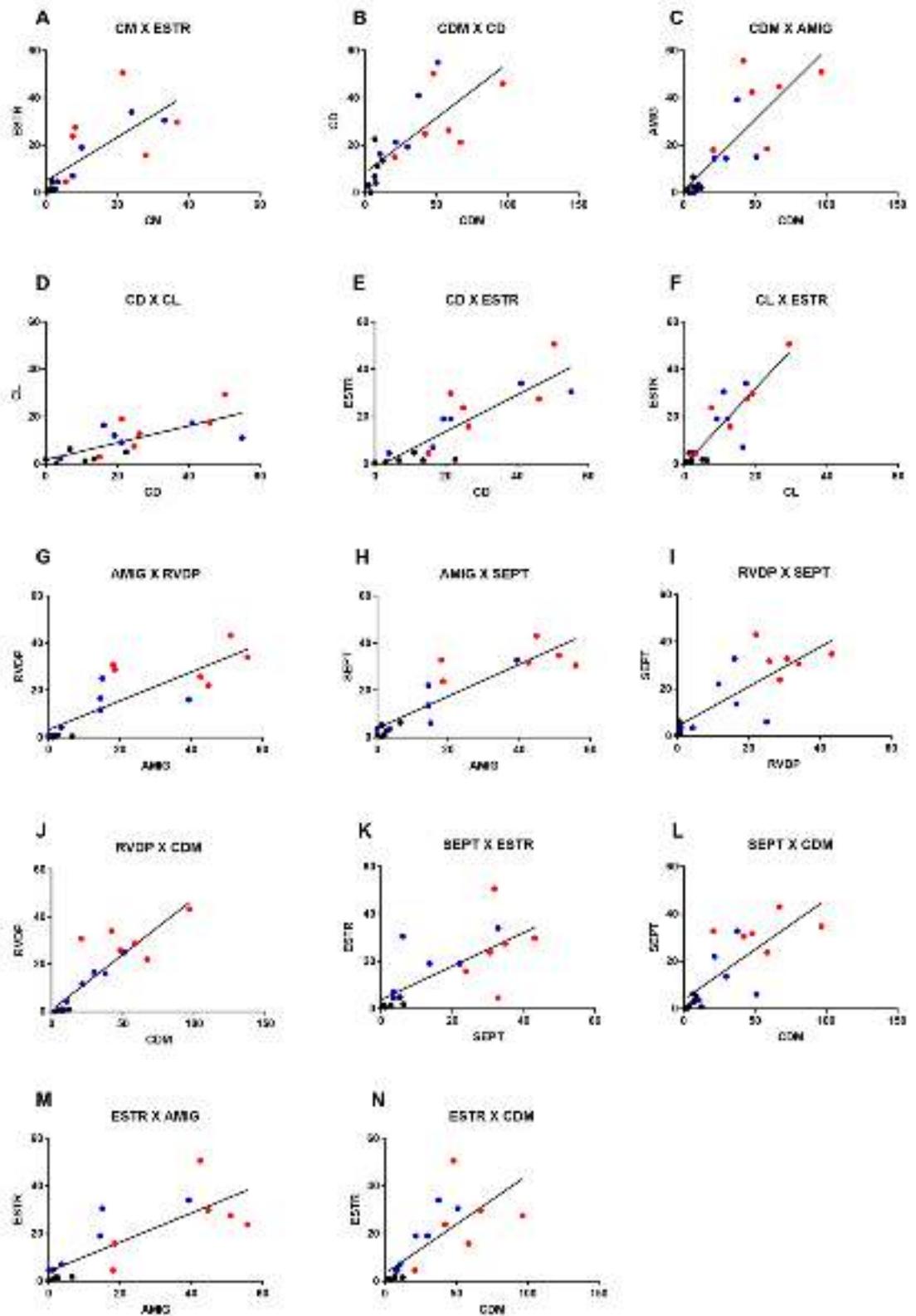


Figura 14: Correlação entre áreas hipocâmpais e não hipocâmpais do lagarto *Tropicurus hispidus* sendo essas correções: (A) CM x ESTR, (B) CDM x CD, (C) CDM x AMIG, (D) CD x CL, (E) CD x ESTR, (F) CL x ESTR, (G) AMIG x RVDP, (H) AMIG x SEPT, (I) RVDP x SEPT, (J) RVDP x CDM, (K) SEPT x ESTR, (L) SEPT x CDM, (M) ESTR x AMIG, (N) ESTR x CDM. Teste de correlação de Pearson foi aplicado e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. CM – Córteix Medial; CDM – Córteix

Dorsomedial; CD – Córtex Dorsal; CL – Córtex Lateral; AMÍG – Amígdala; RVDP – Região Ventricular Dorsal Posterior; SEPT – Septo; ESTR – Estriado.

Relação área x área

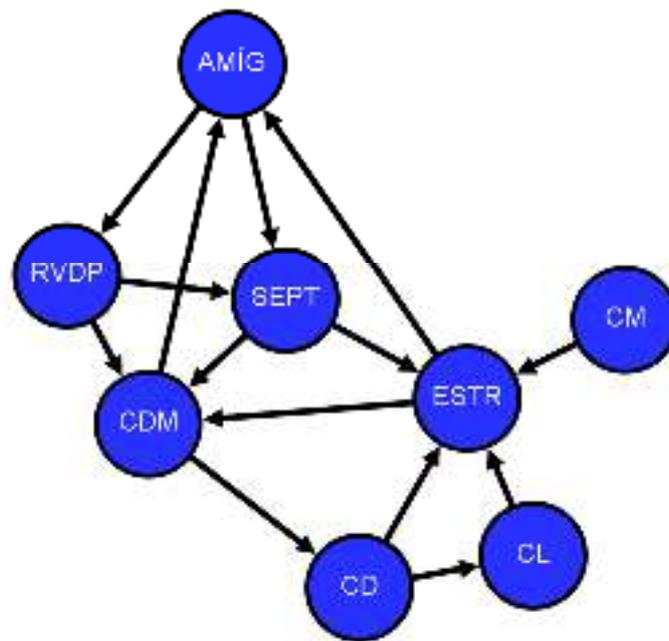


Figura 15: Representação gráfica da correlação entre todas as áreas hipocampais e não hipocampais. Foi utilizado o algoritmo Atlas 2 do programa Gephi, que organiza as áreas baseada em quantas correlações esta possui com outras áreas. CM – Córtex medial; CDM – Córtex dorso medial; CD – Córtex dorsal; CL – Córtex lateral; AMÍG – Amígdala; RVDP – Região ventricular dorsal posterior; ESTR – Estriado; SEPT - Septo.

5.4 Relação entre comportamento e ativação de áreas telencefálicas após exposição a um estímulo neutro ou aversivo.

Para o parâmetro de distância percorrida, correlacionando o número de células ativadas com esse dado comportamental, foi visto pelo teste de correlação de Pearson que houve correlações negativas com as seguintes áreas: AMÍG ($p= 0,0408$ $r= -0,5220$) e SEPT ($p= 0,0012$ $r= -0,7869$) (Tabela 1).

O tempo de imobilidade foi correlacionado com o número de células ativadas através do teste de Pearson, e foi encontrado uma correlação positiva e significativa nas regiões do: CDM ($p= 0,0489$ $r= 0,5000$), CL ($p= 0,0480$ $r=$

0,5023), RVDP ($p= 0,0118$ $r= 0,6450$), AMIG ($p= 0,0346$ $r= 0,5413$) e SEPT ($p= 0,0153$ $r= 0,6225$) (Tabela 1).

Na latência para o primeiro deslocamento e áreas telencefálicas possivelmente envolvidas, o teste de correlação de Pearson se mostrou positivo e significativo para as áreas: CDM ($p= 0,0267$ $r= 0,5694$), RVDP ($p= 0,0054$ $r= 0,7024$), AMIG ($p= 0,0276$ $r= 0,5657$), ESTR ($p= 0,0459$ $r= 0,5079$) e SEPT ($p= 0,0030$ $r= 0,7398$) (Tabela 1).

Quanto ao parâmetro de latência para o primeiro movimento, o teste de correlação de Pearson mostrou que houve uma correlação significativa e positiva somente no ESTR ($p=0,0214$ $r= 0,5913$) (Tabela 1).

Para o parâmetro número de entrada nos quadrantes não foi encontrada nenhuma correlação, visto que após a exposição, tanto ao estímulo neutro quanto ao aversivo, os animais que se moveram, não saíram do quadrante de origem. (Tabela 1).

Foi expresso também em forma de grafo produzido pelo *Gephy*, um resumo das correlações entre área e comportamento (Figura 16). A diferença entre esse grafo o apresentado na figura 15, é que foi observado pelos teste de correlação realizado no Prism que algumas áreas possuíam correlações negativas com alguns comportamentos, como foi o caso do Septo e Amig ao comparar aos dados do comportamento de distância percorrida. Logo, o peso que foi dado para a correlação negativa foi diferente do peso apresentado para a correlação positiva, e isso é evidenciado na figura 16.

Tabela 1: Correlação entre o número de células c-Fos positivas e dados comportamentais dos parâmetros: Distância percorrida, Tempo de imobilidade, Latência para o primeiro movimento deslocamento e Latência para o primeiro movimento. Foi aplicado teste de correlação de Pearson, e valores de $p<0,05$ foram considerados significativos. CDM – Córtex dorso medial; CL – Córtex lateral; AMÍG – Amígdala; RVDP – Região ventricular dorsal posterior; ESTR – Estriado; SEPT - Septo.

Comportamento	Região	Valor de p	Grau de correlação (r)
Distância percorrida	AMÍG	0,0408	-0,5220
	SEPT	0,0012	-0,7869
Tempo de Imobilidade	CDM	0,0489	0,5000
	CL	0,0480	0,5023
	RVDP	0,0118	0,6450
	AMÍG	0,0346	0,5413
	SEPT	0,0153	0,6225
Latência para o primeiro deslocamento	CDM	0,0267	0,5694
	RVDP	0,0054	0,7024
	AMÍG	0,0276	0,5657
	ESTR	0,0459	0,5079
	SEPT	0,0030	0,7398
Latência para o primeiro movimento	ESTR	0,0214	0,5913

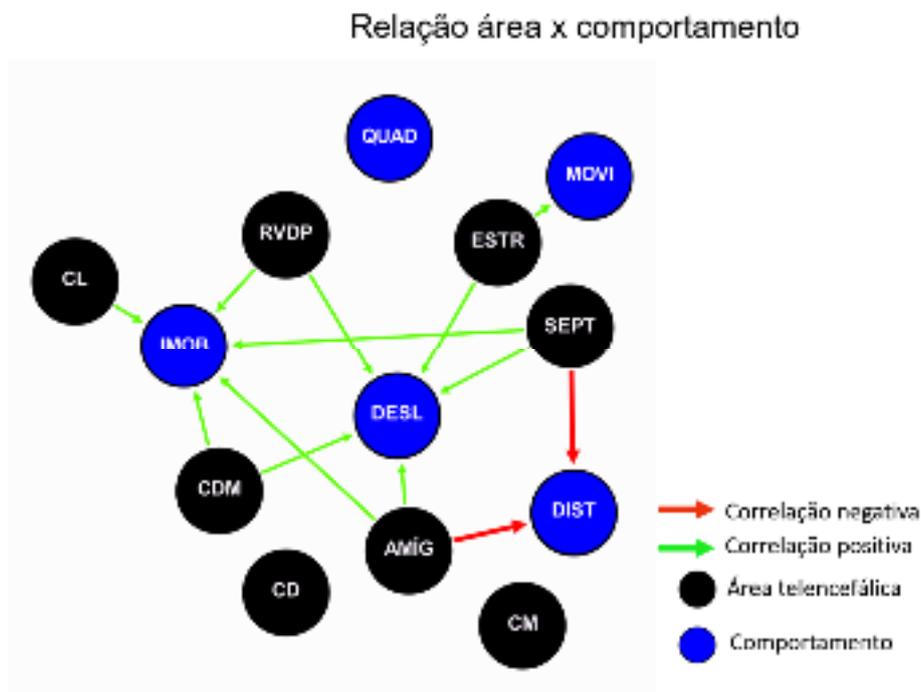


Figura 16: Representação gráfica da correlação entre os comportamentos do *T. hispidus* após exposição a um estímulo neutro ou aversivo e as áreas hipocâmpicas e não hipocâmpicas. Foi utilizado o algoritmo Atlas 2 do programa Gephi, que organiza os dados baseado em quantas correlações possui com outras áreas. CM – Córtex medial; CDM – Córtex dorso medial; CD – Córtex dorsal; CL – Córtex lateral; AMÍG – Amígdala; RVDP – Região ventricular dorsal posterior; ESTR – Estriado; SEPT – Septo; DIST – Distância

percorrida; MOVI – Latência para o primeiro movimento; DESL – Latência para o primeiro deslocamento; IMOB – Tempo de imobilidade (ou congelamento); QUAD – Número de entrada nos quadrantes.

Por último foi exibida uma correlação entre todas as áreas e todos os comportamentos apresentados nesse trabalho (Figura 17). Novamente, utilizando os dados processados pelo Prisma, foi utilizado o *Gephy* para exibir um *layout* dessas correlações, e através do algoritmo *Atlas 2* contido no *Gephy*, foram exibidas: 1) Correlações positivas (em verde) entre as áreas cerebrais que aumentaram juntas o número de neurônios quando comparado ao grupo CTR; 2) Correlações positivas entre o número de neurônios ativados e os comportamentos apresentados pelos animais e 2) Correlações negativas entre o número de neurônios ativados e o comportamento exibido pelos animais.

Relação área x área x comportamento

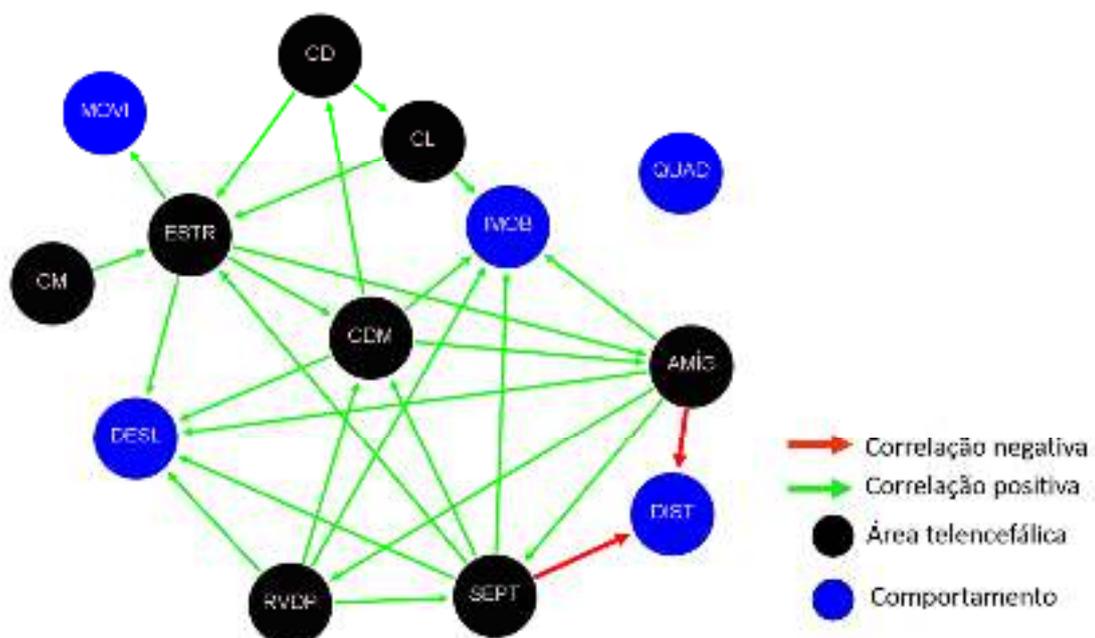


Figura 17: Representação gráfica da correlação entre os comportamentos do *T.hispidus* após exposição a um estímulo neutro ou aversivo e todas as áreas hipocampais e não hipocampais. Foi utilizado o algoritmo Atlas 2 do programa Gephi, que organiza os dados baseado em quantas correlações possui com outras áreas e comportamentos. CM – Córtex medial; CDM – Córtex dorso medial; CD – Córtex

dorsal; CL – Córtex lateral; AMÍG – Amígdala; RVDP – Região ventricular dorsal posterior; ESTR – Estriado; SEPT – Septo; DIST – Distância percorrida; MOVI – Latência para o primeiro movimento; DESL – Latência para o primeiro deslocamento; IMOB – Tempo de imobilidade (ou congelamento); QUAD – Número de entrada nos quadrantes.

6 DISCUSSÃO

Na etapa comportamental foi observado que animais do grupo EA, quando comparados aos animais do grupo EN, apresentaram menor distância percorrida, maior tempo de congelamento, maior latência para iniciar um deslocamento e menor latência para iniciar um movimento. Esses dados foram acompanhados de um aumento do número de células c-Fos positivas, para o grupo EA nas áreas: Córtex Medial, Córtex Dorsomedial, Córtex Lateral, Amígdala, Estriado, Septo, e Região Ventricular Dorsal Posterior.

Espécies, quando confrontadas com algum estímulo aversivo, podem exibir comportamentos que ajudam nas chances de sobrevivência do indivíduo. Dentre esses comportamentos já estudados, os principais são: congelamento (BORKAR; FADOK, 2021), fuga do local (CRUZ et al., 2020), diminuição da atividade locomotora (DAY; CREWS; WILCZYNSKI, 1999), ou como último recurso, enfrentar o predador (BLANCHARD et al., 2011). Em répteis, com ênfase em lagarto, algumas espécies podem ainda apresentar alguns comportamentos mais específicos como: deixar em evidência para o predador partes do corpo que possuam coloração amarela (ABRAMJAN et al., 2020), perda da cauda como forma de distração (GALDINO et al., 2006), congelamento (MEDEIROS, 2019), inflar o tórax (MACHADO; GALDINO; SOUSA, 2007) e vocalização (CAPSHAW et al., 2021).

Alguns comportamentos ainda podem ser vistos como forma de comunicação quer seja entre indivíduos da mesma espécie ou de presa ante o predador. Siqueira *et al.*, (2009) mostraram que comportamentos como lambar o substrato, arquear as costas, expor a cloaca, correr, olhar ao redor, e fazer

movimentos verticais com a cabeça podem ser utilizados com a finalidade de comunicar-se com indivíduos da mesma espécie, sendo estes machos e fêmeas.

Coelho, Bruinjé e Costa (2018), também observaram alguns comportamentos associados a comunicação entre específicos. Nesse estudo eles colocaram lagartos da espécie *Tropidurus semitaeniatus* em um campo aberto onde eram separados por uma divisória. Aos pares os animais foram colocados e ao remover a divisão houve a comunicação entre eles a fim de determinar a dominância sobre eles. Dentre os comportamentos, puderam ser vistos: movimento vertical de cabeça, lambar o solo, se mover em direção ao outro de maneira rápida ou devagar, exibir a parte dorsal do corpo, perseguir, morder, lutar, balançar a cauda, e se afastar do outro lagarto.

Comportamentos como o de balançar a cabeça, mover a cauda, e exibir a parte dorsal do corpo sugerem ser comportamentos para definir a dominância, onde o lagarto que realizar mais movimentos de cabeça está reforçando sua dominância sobre o outro, assim como mover a cauda é um sinal de subordinação.

Estes resultados são importantes a fim de comparativos com a presente dissertação, pois é notável que alguns comportamentos dos *Tropidurus* em geral, podem ter diferentes significado a depender se a situação for aversiva ou de comunicação com seus coespecíficos.

Nos resultados presentes então, será possível observar que os animais apresentaram comportamento de olhar ao redor como uma possível avaliação de risco, mostrando que alguns comportamentos são conservados em diferentes situações.

A distância percorrida é um dos muitos parâmetros utilizados para se avaliar atividade locomotora em diversos tipos de estudos, incluindo estudos relacionados ao medo e ansiedade (BARRY, 2013; ENGEL et al., 2018; SIMONE; MALIVOIRE; MCCORMICK, 2015; VAN REENEN et al., 2009; ZENKI et al., 2020). Nesse tipo de experimento, quando um indivíduo é exposto a um novo ambiente, irá ocorrer o processo de exploração do meio, com possível

aumento da atividade locomotora, em que as informações serão coletadas pelos sentidos e então avaliadas se apresentam ideia de perigo ou algo que possa gerar danos físicos a este indivíduo. Dentro desse contexto é visto que animais que são expostos a ambientes que indiquem a presença de um predador, como seu odor ou ao próprio predador, apresentam distância percorrida reduzida quando comparado a animais que não foram expostos ao mesmo estímulo (DIELENBERG; MCGREGOR, 2001).

Corroborando essa ideia, resultado semelhante foi visto no presente estudo com a espécie de lagarto *Tropidurus hispidus*, onde os animais que foram expostos a gaiola contendo um gato mostraram uma diminuição da distância percorrida quando comparado ao grupo que foi exposto somente a gaiola vazia (Figura 6). Quando comparados os grupos separadamente, tanto o grupo EN quanto o grupo EA mostraram uma diminuição deste parâmetro na fase de exposição, em relação a habituação (Figura 6). No entanto, como supracitado, ao comparar os dois grupos somente na fase exposição, foi visto que o grupo EA se deslocou menos que o grupo EN. Isso denota que ao contrastar a utilização da gaiola vazia com uma gaiola contendo um gato doméstico dentro, esta última operou como um agente aversivo de forma eficaz em relação a primeira, reforçando a utilização deste modelo em estudos que envolvam comportamentos de caráter aversivo.

Quando observados os dados de correlação processados pelo Prism, e através do programa *Gephy* que exibe um layout dessas correlações, foi visto que para a distância percorrida, quanto menor essa distância mais neurônios estão ativados em regiões telencefálicas como Sept e Amig. Esses dados sugerem que essas regiões podem estar relacionadas a modulação de comportamento do animal para que sejam diminuídas as chances do predador notar a presa.

Siqueira *et al.*, (2019) mostraram que na espécie de lagarto *Tropidurus hygomi*, o comportamento de locomoção pode também ser alterado em outras situações que não aversivas. Nesse estudo, lagarto machos adultos foram expostos a outros machos adultos, fêmeas adultas, e juvenis em diferentes momentos. A locomoção dos animais que foram expostos a fêmeas foi maior

do que quando comparado aos outros grupos. Esse ensaio mostrou que o comportamento de locomoção pode ser utilizado também como forma de comunicação entre animais da própria espécie.

Outro parâmetro analisado foi o de tempo de imobilidade ou congelamento, que segundo Perrot-Sinal *et al.*, (1996) e Takahashi, Chan, Pilar, (2008) animais que tem uma atividade exploratória diminuída frente a um estímulo aversivo, apresentam um maior tempo de imobilidade. Os dados do presente estudo, mostraram que ao analisar os grupos EA e EN separadamente, ambos evidenciaram que houve um maior tempo de imobilidade na fase de exposição quando comparado a fase de habituação (Figura 7). O grupo EA mostrou um maior tempo na fase exposição quando comparado a mesma fase do grupo EN. Esses dados mais uma vez mostram que a exposição de um gato em uma gaiola foi capaz de induzir comportamento aversivo de forma eficiente. (Figura 7).

Através dos dados de correlação apresentado pelo Prism e do grafo gerado pelo *Gephy* é possível ver que o tempo de imobilidade pode estar sendo modulado por áreas como o CL, AMIG, SEPT, CDM e RVDP. Ou seja, é possível inferir que quanto mais neurônios estiverem ativados nessas regiões maior o tempo de imobilidade exibido pelos animais, que assim como no parâmetro distância percorrida, é um comportamento importante para que as chances de ser detectado no ambiente sejam reduzidas (Figura 17).

Uma das dificuldades em se trabalhar com o grupo dos répteis, com ênfase em espécies de lagartos, é que as metodologias empregada nos estudos muitas vezes não atendem a ecologia do animal, ou não são possíveis de se replicar em outros estudos (DAY; CREWS; WILCZYNSKI, 1999). Para essa espécie, no entanto, baseada em sua ecologia, que segundo Vanzolini, Ramos-Costa, Vitt (1980), se adaptou bem a vários locais, incluindo os urbanos como construções e muros de casas, foi possível obter um paradigma eficiente, visto que, o contato com felinos do tipo gato doméstico acabou se tornando consequência do meio. Devido a isso, estratégias defensivas como o congelamento se tornam eficazes para que o lagarto não seja detectado por predadores de forma geral.

O paradigma aqui aplicado se mostrou atender a ecologia do animal e os estudos de Medeiros (2019), Santos (2018) e Santos (2016), os quais validaram e replicaram essa metodologia para estudos de memória e medo na mesma espécie, reforçam a eficácia para estudos que envolvam essas temáticas, além de que os dados de congelamento expressos aqui reafirmam que o gato serviu como um bom estímulo aversivo para evocar resposta de medo como essa, visto ser uma das possíveis estratégias para não ser detectado pelo predador em seu ambiente natural.

Um outro parâmetro utilizado no presente estudo foi a análise do número de quadrantes visitados. O número de quadrantes visitados pode ser melhor compreendido utilizando a latência para iniciar um deslocamento. Isso porque ao avaliar somente os quadrantes visitados é possível notar uma diferença significativa em que, o grupo EN visitou menos quadrantes na fase de exposição quando comparado a fase de habituação, semelhança vista para o grupo EA. No entanto ao avaliar ambos os grupos ou na fase de habituação ou na fase de exposição, não foi vista interação entre eles (Figura 10).

Apesar de não ser vista essa diferença na fase exposição, momento em que os animais eram expostos a gaiola vazia ou contendo um gato, é possível observar que os animais do grupo EA não visitaram nenhum quadrante, pois não realizaram nenhum deslocamento, como visto no parâmetro de deslocamento.

Já os animais do grupo EN ainda que também não visitaram nenhum quadrante na fase exposição, os dados de deslocamento sugerem que estes não estavam exibindo o mesmo comportamento de defesa como os animais do grupo EA. Mais uma vez, possivelmente os animais do grupo EN após uma possível reavaliação do contexto, não consideraram a gaiola vazia como estímulo suficiente para ser uma ameaça (Figura 10). Isso sugere que para os estudos futuros, um possível aumento do tempo na fase de exposição seja suficiente para observar essa diferença entre os grupos.

Um ponto a se destacar no parâmetro entrada nos quadrantes, é que ao observar os animais na fase de habituação, estes apresentam resultados

discrepantes um do outro em ambos os grupos, sugerindo uma característica não padronizada dos animais quanto a direção a seguir durante a exploração do ambiente, a velocidade que se movimenta, ou a distância percorrida a cada comportamento de deslocamento. Uma possível forma de verificar essa hipótese, é em estudos futuros incluir variáveis como velocidade do movimento, direção do movimento e distância percorrida a cada deslocamento.

Nesse parâmetro não foi possível observar correlações pelo Prism ou apresentadas no grafo gerado pelo *Gephy*, novamente, devido aos animais durante o período de exposição não terem mostrado diferença entre o número de quadrantes visitados (Figura 17).

Na literatura Perusini e Fanselow (2015), revisaram que é a percepção da presa em relação a seu predador, que irá ditar qual comportamento será realizado. Outros autores complementam que diante de uma situação que pode apresentar perigo ao indivíduo, 3 cenários possíveis podem ser observados: 1) Se há algum sinal do predador como seu cheiro, por exemplo, ratos exibem um comportamento cauteloso de exploração do ambiente, o que é chamado de avaliação de risco. 2) No estado distal, onde há contato visual com o predador ou a fonte do estímulo aversivo, por exemplo, ratos exibem comportamentos de congelamento a fim de não serem percebidos pelo predador, ou se nessa situação for realizada o comportamento de avaliação de risco, e caso haja uma rota de fuga, pode-se fugir por ela. 3) Em último caso, se o predador tiver contato direto com a presa, esta pode exibir movimentos aleatórios e descontrolados para intimidar seu predador, ou lutar com ele pela sua sobrevivência (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988, 1989); BLANCHARD et al., 2001).

No presente estudo, no parâmetro latência para iniciar um movimento, foi possível observar que os animais do grupo EN tiveram um aumento significativo no tempo para iniciar um movimento de cabeça durante a exposição a gaiola vazia, quando comparado a habituação, resultado esse não visto para o grupo EA (Figura 9). Quando comparados os grupos entre si, também foi observado que os animais do grupo EN mostraram um tempo significativamente maior que os animais do grupo EA já na habituação,

resultado esse não observado para a fase de exposição (Figura 9). Nos dados de correlações gerados pelo Prism e no grafo estabelecido pelo *Gephy*, foi possível observar uma correlação na latência para o primeiro movimento e o número de células ativadas somente na área do Estr, e que como discutido mais adiante essa parece ser uma área envolvida com características motora do animal (Figura 17).

O último parâmetro, latência para o primeiro deslocamento, como mostrado na figura 8, realça que os animais do grupo EN durante a exposição levaram mais que o dobro do tempo que levaram na habituação para realizar o primeiro deslocamento. Já os animais no grupo EA, na habituação, mostraram um tempo de até 2 minutos para o primeiro deslocamento, mas durante a exposição, todos os animais desse grupo atingiram o limite de tempo (10 minutos) e não realizaram quaisquer movimentos.

Segundo os dados de correlação do Prism e do grafo gerado pelo *Gephy*, é possível sugerir que esse comportamento pode estar sendo modulado por áreas como RVDP, SEPT, AMIG, CDM e ESTR (Figura 17).

Ainda sobre, foi possível observar que os animais do grupo EN apesar de aumentarem o tempo nesse parâmetro durante a fase de exposição, não atingiram o tempo máximo, sugerindo que após um tempo os animais podem ter reavaliado o contexto, através da avaliação de risco, e não reconheceram a gaiola vazia como um estímulo aversivo, facilitando assim seu deslocamento (Figura 8). Já os animais do grupo EA após serem expostos a gaiola contendo um gato, não iniciaram nenhum deslocamento, sugerindo que até o fim dessa fase o estímulo foi considerado como aversivo, mesmo após a avaliação de risco, e não havendo rotas de fuga, a ameaça pode ter continuado como do tipo distal prevalecendo o comportamento de congelamento (Figura 8).

Analisando simultaneamente esse parâmetro junto à latência para o 1º movimento, é possível ver que os animais do grupo EN apesar de terem levado mais tempo para realizar o 1º movimento, levaram menos tempo para realizar o 1º deslocamento, enquanto que os animais do grupo EA, apesar levarem menor tempo para realizarem o 1º movimento, contudo não se deslocaram,

sugerindo assim que os animais do grupo EA realizaram um movimento mais rapidamente para avaliar se era possível fugir do ambiente aversivo ou se deslocar caso não apresentasse perigo.

As alterações comportamentais observadas no presente estudo foram acompanhadas de um aumento da imunorreatividade para c-Fos em diferentes áreas telencefálicas do cérebro dos lagartos do grupo EA, quando comparado aos animais do grupo EN. Quanto ao CM (Figura 11.A), foi observado que os animais do grupo EA apresentaram um aumento significativo do número de células nessa área quando comparado ao grupo CTR. O CM de lagartos, na literatura, é descrito como homólogo ao giro denteado do hipocampo de mamíferos. Isso porque nos lagartos essa estrutura envia projeções para áreas como o CDM e CD, semelhante as projeções do giro dentado para regiões de CA3, CA2 e CA1 em mamíferos. Essas projeções em lagartos, exibem marcações para zinco semelhantes ao que acontece com as fibras musgosas nos mamíferos. (LANUZA et al., 1997; DE CARVALHO PIMENTEL et al., 2011). O GD descrito em mamíferos participa de muitos processos, sendo alguns deles, a codificação de informações sensoriais captadas do meio, a fim de criar uma representação espacial do ambiente (KESNER, 2013). Além disso ele participa na formação de memórias do tipo espacial, ou seja, os tipos de memória que estão envolvidas em saber os locais que possuem alimentos ou água, onde fica o território inimigo, ou se aquele ambiente representa perigo baseado em experiências prévias (BRUCE; NEARY, 1995; GEINISMAN; DE TOLEDO-MORRELL; MORRELL, 1986; KESNER, 2013; NILSSON et al., 1999). Baseado nisso é possível sugerir que não houve diferença entre o grupo EA e o EN devido a estes, independente do estímulo ser considerado aversivo ou não, necessitarem do CM para processar as informações captadas do ambiente e gerar uma representação espacial. Além disso, ter sido observado diferença entre o grupo EA e CTR e não entre EN e CTR infere que a quantidade de informações processadas pelo grupo EA foi maior já que no contexto, havia o gato como perigo real, diferente da gaiola.

O CDM é considerado homólogo a região CA3 de mamíferos devido as projeções de zinco provindas do CM (BRUCE; NEARY, 1995; LOPEZ-

GARCIA et al., 2002; SRIVASTAVA; MAURYA; CHAND, 2009; WOUTERLOOD, 1981). O papel da região CA3 é amplamente estudada na literatura em contextos aversivos, e estudos como o de Cravens *et al.*, (2006) mostra que especificamente os receptores NMDA localizado nessa região desempenham função importante para o reconhecimento do contexto, e quando alterado sua funcionalidade prejudica a percepção do indivíduo quanto a representação do meio. Nos resultados apresentados na Figura 11.B é possível observar que o grupo EA apresentou um aumento significativo de células marcadas para c-Fos, o que pode indicar uma maior participação dessa área no contexto aversivo, resultado esse não visto quando comparado o grupo EN e CTR.

Apesar do estudo de Cravens *et al.*, (2006) sobre o papel do CA3 no reconhecimento do contexto, é sabido que o hipocampo também está relacionado a formação e consolidação de memórias. Dito isso, um estudo de Daumas *et al.*, (2005) mostrou que a região CA3 está envolvida na aquisição e consolidação de memórias, e não no reconhecimento do contexto de forma geral. Apesar de contraditório, é plausível que essa região desempenhe mais de um papel a depender do modelo estudado, devido a isso é reforçado a necessidade em se aprofundar estudos nessas áreas. No atual caso, o CDM do lagarto *T. hispidus* pode tanto estar envolvido na avaliação do contexto quanto na aquisição de memória.

A literatura descreve o CD sendo homólogo as regiões de CA1 e CA2 do hipocampo de mamíferos. Nossos resultados não mostraram diferenças entre os grupos nessa região (Figura 11.C), no entanto há sugestões para isso: 1) foi mostrado no trabalho de Santos (2018), com a mesma espécie de lagarto, que essa estrutura não é necessária para a expressão de respostas aversivas. Isso porque mesmo inibindo essa área com Muscimol, um agonista gabaérgico, os animais apresentaram respostas de medo quando reexpostos ao gato no dia seguinte. 2) Ainda que o hipocampo de mamíferos (CA1, CA2 e CA3) esteja envolvido em processos de memória, as áreas CA1 e CA2 observadas na literatura, possuem papel nas memórias de longo prazo (DUDEK; ALEXANDER; FARRIS, 2016; MIZUNO et al., 2020), enquanto que CA3 nas

memórias de curto prazo (REBOLA; CARTA; MULLE, 2017). Baseado no modelo de estímulo aversivo apresentado nessa dissertação, e no tempo em que os animais foram expostos e perfundidos, a memória de curto prazo seria a única em estágio de formação evidenciando assim uma menor participação do CD na parte motora do animal.

O CL de lagartos é descrito por Martinez-Garcia *et al.*, (1986) como homólogo ao córtex entorrinal de mamíferos, pois recebe projeções advindas do bulbo olfatório e envia projeções para o córtex medial a fim de contribuir para a formação da representação espacial. É sabido que o córtex entorrinal em mamíferos é bem desenvolvido já que estes se utilizam do olfato como uma das formas de captar informações do meio em que se encontra. No caso dos répteis, muitas espécies se utilizam do olfato para ir atrás de alimento ou parceiros, sendo estudos desenvolvidos para entender como é a estrutura de olfação e suas conexões cerebrais (KRATZING, 1975; NOBLE; KUMPF, 1936; SCHWENK, 1993). No entanto, a olfação é geralmente utilizada em animais categorizados como forrageadores ativos, aqueles que vão atrás de seu alimento, e possuem essa estrutura bem desenvolvida. Para os lagartos do tipo senta-e-espera como o caso do *T. hispidus* essa estrutura se apresenta morfológicamente esguia, na porção final do CD, conforme mostrado na figura 2, e até então não se tem estudos aprofundados nessa espécie o quanto essa estrutura pode participar do processo de comportamento tipo medo e formação de memória.

Nossos resultados mostraram que os animais do grupo EA tiveram um aumento significativos de células c-Fos positivas quando comparado ao grupo CTR, mas não foi vista essa diferença ao comparar com o grupo EN, nem comparando o EN com o CTR. Lewis e Gould (2007) em sua revisão apontam que o córtex entorrinal em mamíferos, não está somente relacionado a olfação, sendo também observado que esta estrutura envia projeções para a AMIG, e esta última irá regular comportamentos de medo como congelamento. Visto que o *T. hispidus* é um forrageador do tipo senta-e-espera, e a hipótese inicial é que esses animais utilizam mais a visão para identificar suas presas e menos a olfação para mesmo propósito, podemos sugerir que o CL nesses animais pode

estar atuando de forma indireta no comportamento de medo apresentado pelos animais que foram expostos ao gato, visto que diante da gaiola vazia, não foi possível observar essa mesma contribuição da área.

A AMIG dos répteis juntamente com a RVDP, juntas são homólogas a amígdala basolateral em mamíferos, devido ao padrão de conexões que são enviadas e recebidas entre essas e áreas corticais e talâmicas (LANUZA, 1998; LANUZA et al., 1997). Já é definido na literatura que a ABL é o primeiro centro de processamento de informações de natureza aversiva. Essa estrutura recebe projeções vindas tanto do tálamo, quanto do córtex associativo, e logo em seguida modula sinais para a segunda parte da amígdala, também chamada de amígdala central (CeA). Regiões como NRCP, PAG, NLET, LC, NP, NMDV, e outras, receberão sinal da CeA e assim irão modular alguns comportamentos como o de congelamento, e respostas fisiológicas (BOCCHIO; NABAVI; CAPOGNA, 2017; YANG et al., 2021; SANDERS; WILTGEN; FANSELOW, 2003).

Nos resultados apresentados no presente estudo, acerca das áreas como RVDP e AMIG (Figura 11.E e 11.F respectivamente), é possível observar que os animais do grupo EA apresentaram diferença significativa quando comparado com o grupo EN e com o grupo CTR. O grupo EN só mostrou diferença quando comparado com o grupo CTRL na RVDP (Figura 11.E). Estes achados indicam que nos animais expostos ao gato, houve uma maior participação da AMIG em processar as informações aversivas, dado que a gaiola vazia não atuou como estímulo aversivo.

Quando observados juntamente com os dados comportamentais, é possível ver que os animais do grupo EA apresentaram um maior tempo de congelamento, uma menor distância percorrida e uma maior latência para iniciar um 1º deslocamento, comportamentos esses exibidos diante de uma situação de perigo onde se tem o cuidado em não chamar a atenção do predador.

Outra área analisada foi o ESTR (Figura 11.G), que já descrito na literatura como sendo uma das responsáveis por atividades motoras nesses

animais, uma vez que conforme apresentado por Bruce e Butler (1984), eletroestimulação nessa região promoveu movimentos tanto nas patas dianteiras, como na mandíbula e olhos. Além disso Martínez-García *et al.*, (1993) completam que a região do ESTR em lagartos recebe projeções da amígdala e assim é modulada por essa. Nossos resultados para a região motora em questão mostram que, os animais do grupo EA apresentaram um número maior de células c-Fos positivas quando comparado ao controle, mas não houve diferença ao comparar com o grupo EN. Já o grupo EN mostrou uma diferença significativa quando comparado somente ao grupo CTR. É possível observar também que o número de células c-Fos positivas no grupo EA foi quase o dobro do número apresentado pelos animais do grupo EN. É importante destacar esse ponto, visto que mesmo que o córtex motor nos animais que foram expostos ao estímulo aversivo possivelmente estivesse mais ativo, o animal percorreu uma menor distância menor, um maior tempo de congelamento, e se deslocou menos que os animais que somente foram expostos a gaiola vazia. Isso pode indicar que nesse momento o ESTR dos animais expostos ao gato estaria envolvido nos movimentos de cabeça (dados não apresentados) a fim de avaliar o contexto aversivo, visto que para esse parâmetro (latência para iniciar o 1º movimento), esses se mostraram mais ativos.

Os animais do grupo EN apesar de mostrarem um aumento significativo do número de células c-Fos quando comparado ao CTR, é possível observar que a área em questão estaria mais envolvida na locomoção do animal, visto que como apresentado anteriormente, a sugestão de que após uma avaliação, esses animais não consideraram a gaiola como estímulo aversivo, permitindo assim uma maior atividade exploratória.

Para a última área analisada, o SEPT, a diferença estatística foi apenas observada no grupo EA quando comparado ao grupo EN e CTR. O SEPT em lagartos é descrito como semelhante ao septo em mamíferos, visto que essa estrutura recebe projeções da AMIG e envia projeções para áreas como o GD, tendo seu papel tanto formação de memórias quanto comportamento de medo

(BESNARD et al., 2019; DAVIES et al., 2002; FONT et al., 1998; OKAMOTO; AIZAWA, 2013).

Um dos comportamentos modulados pelo SEPT é o congelamento, que segundo (DAVIES et al., 2002) quando lesionada essa área na espécie de lagarto *Podarcis hispanica*, houve uma redução desse comportamento. Quando comparado à os achados dessa dissertação é possível observar que os animais do grupo EA permaneceram em congelamento durante toda a sessão de exposição ao gato, e que juntamente aos dados de marcação para c-Fos indicam que possivelmente essa área estava atuando para que o comportamento fosse expresso de maneira acentuada.

7 CONCLUSÃO

Através do presente trabalho foi possível observar que lagartos da espécie *Tropidurus hispidus* apresentam comportamento de medo modulado por áreas como: Córtex medial, Córtex dorsomedial, Córtex Lateral, Amígdala, Estriado e Septo, mas não Córtex dorsal. Além disso, esse trabalho corrobora que utilizar o modelo de um gato doméstico serve como estímulo aversivo suficiente para aprofundar os conhecimentos na área da neurobiologia do medo.

Estudos futuros inibindo ou super ativando as áreas citadas podem elucidar o papel individual de cada uma delas para o comportamento de medo.

8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A pandemia foi a limitação crucial, visto que além de pensar no bem estar dos animais, todo o horário de atividades do laboratório, assim como o número de pessoas lá presente teve de ser reajustado.

A parte Imunohistoquímica teve de ser limitada a um número de pessoas, e como ocorrem experimentos em paralelo, tivemos agenda restrita para quais dias poderíamos fazer essa etapa super importante do projeto.

Uma das limitações necessária a serem ressaltadas com relação aos lagartos da espécie *Tropidurus hispidus*, é que como estes foram capturados na natureza, não se teve conhecimento de quais estímulos prévios os mesmos foram expostos, existindo portanto, a possibilidade dos resultados aqui apresentados terem sofrido interferência dessa possível pré-exposição. A forma como esse fator poderá ser descartado em estudos posteriores, é através da criação e manutenção de lagartos dessa espécie, desde o momento de seu nascimento até a perfusão.

9 PERSPECTIVAS PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Diante dos dados apresentados nessa dissertação, tem-se uma melhor compreensão de quais áreas podem estar envolvidas no comportamento de medo do lagarto *Tropidurus hispidus*. Com base nisso, para estudos futuros, pretende-se manipular as áreas citadas nesse projeto, tanto inibindo-as quanto super ativando-as, a fim de observar detalhadamente o papel de cada uma no desempenho de sobrevivência desses animais frente a uma situação de perigo.

REFERÊNCIA

ABAYARATHNA, T.; WEBB, J. K. Effects of incubation temperatures on learning abilities of hatchling velvet geckos. **Animal Cognition**, v. 23, n. 4, p. 613–620, 2020.

ABEL, T.; LATTAL, K. M. **Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval** *Current Opinion in Neurobiology* Elsevier Ltd, , 1 abr. 2001.

ABRAMJAN, A. et al. Ultraviolet reflectance and pattern properties in leopard geckos (*Eublepharis macularius*). **Behavioural Processes**, v. 173, p. 104060,

1 abr. 2020.

ADOLPHS, R. et al. Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. **Nature**, v. 372, n. 6507, p. 669–672, dez. 1994.

ALBUQUERQUE, R. L. et al. Geographical Ecology of *Tropidurus hispidus* (Squamata: Tropiduridae) and *Cnemidophorus ocellifer* (Squamata: Teiidae) in a Neotropical Region: A Comparison among Atlantic Forest, Caatinga, and Coastal Populations. **Journal of Herpetology**, v. 52, n. 2, p. 145–155, jun. 2018.

ALENAZI, F. S. H.; IBRAHIM, B. A.; BRISKI, K. P. Re-purposing of histological tissue sections for corroborative western blot analysis of hypothalamic metabolic neuropeptide expression following delineation of transactivated structures by Fos immuno-mapping. **Neuropeptides**, v. 50, p. 29–33, 3 nov. 2015.

BARNEA, A.; PRAVOSUDOV, V. Birds as a model to study adult neurogenesis: Bridging evolutionary, comparative and neuroethological approaches. **European Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 6, p. 884–907, set. 2011.

BARRY, M. J. Effects of fluoxetine on the swimming and behavioural responses of the Arabian killifish. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 2, p. 425–432, mar. 2013.

BESNARD, A. et al. Dorsolateral septum somatostatin interneurons gate mobility to calibrate context-specific behavioral fear responses. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 436–446, 1 mar. 2019.

BLANCHARD, D. C. et al. Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 4, p. 991–998, mar. 2011.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. **Ethoexperimental approaches to the biology of emotion.** *Annual review of psychology*, 1988.

BLANCHARD, R. J. et al. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7–8,

p. 587–595, 1 dez. 2001.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **Journal of Comparative Psychology**, v. 103, n. 1, p. 70–82, 1989.

BOCCHIO, M.; NABAVI, S.; CAPOGNA, M. **Synaptic Plasticity, Engrams, and Network Oscillations in Amygdala Circuits for Storage and Retrieval of Emotional Memories**NeuronCell Press, , 17 maio 2017.

BOISSY, A. Fear and fearfulness in animals. **Quarterly Review of Biology**, v. 70, n. 2, p. 165–191, 1995.

BORKAR, C. D.; FADOK, J. P. A novel pavlovian fear conditioning paradigm to study freezing and flight behavior. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2021, n. 167, p. 1–13, 1 jan. 2021.

BRISCOE, S. D.; RAGSDALE, C. W. **Homology, neocortex, and the evolution of developmental mechanisms**ScienceAmerican Association for the Advancement of Science, , 12 out. 2018.

BRUCE, L. L.; BUTLER, A. B. Telencephalic connections in lizards. I. Projections to cortex. **Journal of Comparative Neurology**, v. 229, n. 4, p. 585–601, 1984.

BRUCE, L. L.; NEARY, T. J. **The limbic system of tetrapods: a comparative analysis of cortical and amygdalar populations**.**Brain, behavior and evolution**, 1995.

CALIXTO, A. V. et al. Nitric oxide involvement and neural substrates of the conditioned and innate fear as evaluated in the T-maze test in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 189, n. 2, p. 341–349, 3 jun. 2008.

CAPSHAW, G. et al. Reptile sound production and perception. In: **Neuroendocrine Regulation of Animal Vocalization**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 101–118.

CARRIVE, P.; LEE, J.; SU, A. Lidocaine blockade of amygdala output in fear-conditioned rats reduces Fos expression in the ventrolateral periaqueductal

gray. **Neuroscience**, v. 95, n. 4, p. 1071–1080, 1 dez. 1999.

CHAPMAN, W. P. et al. Physiological Evidence Concerning Importance of the Amygdaloid Nuclear Region in the Integration of Circulatory Function and Emotion in Man. **Science**, v. 120, n. 3127, p. 949–950, 3 dez. 1954.

COELHO, F. E. A.; BRUINJÉ, A. C.; COSTA, G. C. Ethogram with the Description of a New Behavioral Display for the Striped Lava Lizard, *Tropidurus semitaeniatus*. **South American Journal of Herpetology**, v. 13, n. 1, p. 96–101, 2018.

COOK, M. et al. Observational conditioning of snake fear in unrelated rhesus monkeys. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 94, n. 4, p. 591–610, nov. 1985.

COOPER, W. E. Foraging mode, prey chemical discrimination, and phylogeny in lizards. **Animal Behaviour**, v. 50, n. 4, p. 973–985, 1 jan. 1995.

COUNTRYMAN, R. A. et al. CREB phosphorylation and c-Fos expression in the hippocampus of rats during acquisition and recall of a socially transmitted food preference. **Hippocampus**, v. 15, n. 1, p. 56–67, 2005.

CRAVENS, C. J. et al. CA3 NMDA receptors are crucial for rapid and automatic representation of context memory. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 6, p. 1771–1780, 1 set. 2006.

CRUZ, A. et al. Freezing Displayed by Others Is a Learned Cue of Danger Resulting from Co-experiencing Own Freezing and Shock. **Current Biology**, v. 30, n. 6, p. 1128–1135.e6, 23 mar. 2020.

DAUMAS, S. et al. Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: Differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. **Learning and Memory**, v. 12, n. 4, p. 375–382, 1 jul. 2005.

DAVERN, P. J. **A role for the lateral parabrachial nucleus in cardiovascular function and fluid homeostasis** *Frontiers in Physiology* Frontiers Research Foundation, , 18 nov. 2014.

DAVIES, D. C. et al. Striato-amygdaloid transition area lesions reduce the

duration of tonic immobility in the lizard *Podarcis hispanica*. **Brain Research Bulletin**, v. 57, n. 3–4, p. 537–541, 2002.

DAY, B. L.; CREWS, D.; WILCZYNSKI, W. Effects of medial and dorsal cortex lesions on spatial memory in lizards. **Behavioural Brain Research**, v. 118, n. 1, p. 27–42, 2001.

DAY, L. B.; CREWS, D.; WILCZYNSKI, W. Spatial and reversal learning in congeneric lizards with different foraging strategies. **Animal Behaviour**, v. 57, n. 2, p. 393–407, 1 fev. 1999.

DE CARVALHO PIMENTEL, H. et al. Structural organization of the cerebral cortex of the neotropical lizard *Tropidurus hispidus*. **Cell and Tissue Research**, v. 343, n. 2, p. 319–330, 2011.

DÍAZ-URIARTE, R. Anti-predator behaviour changes following an aggressive encounter in the lizard *Tropidurus hispidus*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 266, n. 1437, p. 2457–2464, 22 dez. 1999.

DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. **Defensive behavior in rats towards predatory odors: A review** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* Elsevier Ltd, , 1 dez. 2001.

DUDEK, S. M.; ALEXANDER, G. M.; FARRIS, S. Rediscovering area CA2: unique properties and functions. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 89–102, 25 fev. 2016.

DUVARCI, S.; PARE, D. **Amygdala microcircuits controlling learned fear** *Neuron* Cell Press, , 4 jun. 2014.

ENGEL, O. et al. Imepitoin shows benzodiazepine-like effects in models of anxiety. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. NOV, 1 nov. 2018.

FANSELOW, M. S.; PENNINGTON, Z. T. A return to the psychiatric dark ages with a two-system framework for fear. **Behaviour Research and Therapy**, v. 100, p. 24–29, 1 jan. 2018.

FARIVAR, R.; ZANGENEHPOUR, S.; CHAUDHURI, A. **Cellular-resolution activity mapping of the brain using immediate-early gene**

expression *Frontiers in Bioscience* *Frontiers in Bioscience*, , 2004.

FILIPKOWSKI, R. K. et al. Tactile experience induces c-Fos expression in rat barrel cortex. **Learning and Memory**, v. 7, n. 2, p. 116–122, mar. 2000.

FOÀ, A. et al. Orientation of lizards in a Morris water-maze: Roles of the sun compass and the parietal eye. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 18, p. 2918–2924, 2009.

FONT, C. et al. **Septal Complex of the Telencephalon of Lizards: III. Efferent Connections and General Discussion** *J. Comp. Neurol.* [s.l: s.n.].

FOX, A. S. et al. Extending the amygdala in theories of threat processing. **Trends in Neurosciences**, v. 38, n. 5, p. 319–329, 1 maio 2015.

GAFFORD, G. M.; RESSLER, K. J. **Mouse models of fear-related disorders: Cell-type-specific manipulations in amygdala** *Neuroscience* Elsevier Ltd, , 3 maio 2016.

GALDINO, C. A. B. et al. Defense behavior and tail loss in the endemic lizard *Eurolophosaurus nanuzae* (Squamata, Tropiduridae) from southeastern Brazil. **Phyllomedusa**, v. 5, n. 1, p. 25–30, 1 jun. 2006.

GALLO, F. T. et al. Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, n. April, p. 1–16, 2018.

GANDOLFI, D. et al. Activation of the CREB/c-Fos pathway during long-term synaptic plasticity in the cerebellum granular layer. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, p. 184, 28 jun. 2017.

GEINISMAN, Y.; DE TOLEDO-MORRELL, L.; MORRELL, F. Loss of perforated synapses in the dentate gyrus: Morphological substrate of memory deficit in aged rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 9, p. 3027–3031, 1 maio 1986.

GHAEMI KERAHRODI, J.; MICHAL, M. The fear-defense system, emotions, and oxidative stress. **Redox Biology**, p. 101588, jul. 2020.

GODDARD, G. V. Functions of the amygdala. **Psychological Bulletin**, v. 62,

n. 2, p. 89–109, ago. 1964.

GONZÁLEZ, A.; LÓPEZ, J. M. A forerunner of septohippocampal cholinergic system is present in amphibians. **Neuroscience Letters**, v. 327, n. 2, p. 111–114, 19 jul. 2002.

GONZALEZ, A.; RUSSCHEN, F. T.; LOLIMAN, A. H. M. Afferent connections of the striatum and the nucleus accumbens in the lizard gekko gekko. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 36, n. 1, p. 39–48, 1990.

GUPTA, S. et al. Defining structural homology between the mammalian and avian hippocampus through conserved gene expression patterns observed in the chick embryo. **Developmental Biology**, v. 366, n. 2, p. 125–141, 2012.

HALPERN, B. P.; KARTEN, H. J.; HODOS, W. A Stereotaxic Atlas of the Brain of the Pigeon (*Columbia livia*). **The American Journal of Psychology**, v. 81, n. 2, p. 289, 1968.

HORVATH, F. E. Effects of basolateral amygdalectomy on three types of avoidance behavior in cats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 56, n. 2, p. 380–389, abr. 1963.

HUEY, R. B.; PIANKA, E. R. Ecological Consequences of Foraging Mode. **Ecology**, v. 62, n. 4, p. 991–999, ago. 1981.

JAWORSKI, J.; KALITA, K.; KNAPSKA, E. c-Fos and neuronal plasticity: the aftermath of Kaczmarek's theory. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 78, n. 4, p. 287–296, 2018.

KAPPERS, A.; HUBER, G. C.; CROSBY, E. C. The Comparative Anatomy of the Nervous System of Vertebrates, including Man. **Nature**, v. 139, n. 3520, p. 650–651, abr. 1937.

KESNER, R. P. **An analysis of the dentate gyrus function** **Behavioural Brain Research** Elsevier, , 1 out. 2013.

KRATZING, J. E. The fine structure of the olfactory and vomeronasal organs of a lizard (*Tiliqua scincoides scincoides*). **Cell and Tissue Research**, v. 156, n. 2, p. 239–252, fev. 1975.

LABERGE, F. et al. Evolution of the Amygdala: New Insights from Studies in Amphibians. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 67, n. 4, p. 177–187, abr. 2006.

LACEY, D. The organization of the hippocampus of the fence lizard: A light microscopic study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 182, n. 2, p. 247–263, 1978.

LADAGE, L. D. et al. Spatial memory: Are lizards really deficient? **Biology Letters**, v. 8, n. 6, p. 939–941, 2012.

LANUZA, E. et al. Amygdalo-hypothalamic projections in the lizard *Podarcis hispanica*: A combined anterograde and retrograde tracing study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 384, n. 4, p. 537–555, 11 ago. 1997.

LANUZA, E. Identification of the reptilian basolateral amygdala: An anatomical investigation of the afferents to the posterior dorsal ventricular ridge of the lizard *Podarcis hispanica*. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 3517–3534, 1998.

LAURENT, G. et al. Cortical evolution: Introduction to the reptilian cortex. In: **Research and Perspectives in Neurosciences**. [s.l.] Springer Verlag, 2016. p. 23–33.

LEAL, M.; POWELL, B. J. Behavioural flexibility and problem-solving in a tropical lizard. **Biology Letters**, v. 8, n. 1, p. 28–30, 23 fev. 2012.

LEE, J. H.; LEE, S.; KIM, J. H. **Amygdala Circuits for Fear Memory: A Key Role for Dopamine Regulation***The Neuroscientist*SAGE Publications Inc., , 2016.

LEWIS, M. C.; GOULD, T. J. Signal transduction mechanisms within the entorhinal cortex that support latent inhibition of cued fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 88, n. 3, p. 359–368, 1 out. 2007.

LIN, X. et al. c-Fos mapping of brain regions activated by multi-modal and electric foot shock stress. **Neurobiology of Stress**, v. 8, p. 92–102, 1 fev. 2018.

LOPEZ-GARCIA, C. et al. The lizard cerebral cortex as a model to study neuronal regeneration. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 74, n.

1, p. 85–104, 2002.

LUKASIUK, K.; KACZMAREK, L. AP-1 and CRE DNA binding activities in rat brain following pentylentetrazole induced seizures. **Brain Research**, v. 643, n. 1–2, p. 227–233, 18 abr. 1994.

LUZZATI, F. A hypothesis for the evolution of the upper layers of the neocortex through co-option of the olfactory cortex developmental program. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. APR, p. 162, 2015.

MACÊDO-LIMA, M. **Distribuição e caracterização de neurônios NADPHdiaforase-positivos na formação hipocampal do lagarto *Tropidurus hispidus***. São Cristóvão Universidade Federal de Sergipe, , 2013.

MACHADO, L. L.; GALDINO, C. A.; SOUSA, B. M. **DEFENSIVE BEHAVIOR OF THE LIZARD TROPIDURUS MONTANUS (TROPIDURIDAE): EFFECTS OF SEX, BODY SIZE AND SOCIAL CONTEXTS** South American Journal of Herpetology. [s.l.] Brazilian Society of Herpetology, 1 ago. 2007.

MADDOX, S. A. et al. Deconstructing the Gestalt: Mechanisms of Fear, Threat, and Trauma Memory Encoding. **Neuron**, v. 102, n. 1, p. 60–74, 3 abr. 2019.

MARTINEZ-GARCIA, F. et al. Connections of the lateral cortex in the lizard *Podarcis hispanica*. **Neuroscience Letters**, v. 63, n. 1, p. 39–44, 2 jan. 1986.

MARTÍNEZ-GARCÍA, F. et al. Fiber connections of the amygdaloid formation of the lizard *podarcis*. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 41, n. 3–5, p. 156–162, 1993.

MCNALLY, G. P.; JOHANSEN, J. P.; BLAIR, H. T. Placing prediction into the fear circuit. **Trends in Neurosciences**, v. 34, n. 6, p. 283–292, jun. 2011.

MEDEIROS, K. A. A. . **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS NITRÉRGICOS EM RESPOSTA À EXPOSIÇÃO DO LAGARTO NEOTROPICAL *Tropidurus hispidus* (SPIX , 1825) A UM ESTÍMULO AVERSIVO : ENVOLVIMENTO DE VIAS**. [s.l: s.n.].

MISSLIN, R. The defense system of fear: Behavior and neurocircuitry.

Neurophysiologie Clinique, v. 33, n. 2, p. 55–66, 1 abr. 2003.

MIZUNO, K. et al. Long-lasting transcription in hippocampal area CA1 after contextual fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 172, p. 107250, 1 jul. 2020.

MOTTA, S. C.; CAROBREZ, A. P.; CANTERAS, N. S. **The periaqueductal gray and primal emotional processing critical to influence complex defensive responses, fear learning and reward seeking** **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** Elsevier Ltd, , 1 maio 2017.

NAUMANN, R. K. et al. The reptilian brain. **Current Biology**, v. 25, n. 8, p. R317–R321, 2015.

NIEUWENHUYS, R. THE BRAIN OF THE LAMPREY IN A COMPARATIVE PERSPECTIVE. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 299, n. 1, p. 97–145, 1 set. 1977.

NIEUWENHUYS, R.; TEN DONKELAAR, H. J.; NICHOLSON, C. **The Central Nervous System of Vertebrates**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1998.

NIKOLAEV, E.; WERKA, T.; KACZMAREK, L. C-fos protooncogene expression in rat brain after long-term training of two-way active avoidance reaction. **Behavioural Brain Research**, v. 48, n. 1, p. 91–94, 8 maio 1992.

NILSSON, M. et al. **Enriched Environment Increases Neurogenesis in the Adult Rat Dentate Gyrus and Improves Spatial Memory** **J Neurobiol**. [s.l.: s.n.].

NOBLE, G. K.; KUMPF, K. F. The Function of Jacobson's Organ in Lizards. **Pedagogical Seminary and Journal of Genetic Psychology**, v. 48, n. 2, p. 371–382, 1936.

NORTHCUTT, R. G. **Understanding vertebrate brain evolution**. Integrative and Comparative Biology. **Anais...**2002

NUNES, J. V. E.; ELISEI, T.; SOUSA, B. M. DE. Anti-predator behaviour in the Brazilian lizard *Tropidurus itambere* (Tropiduridae) on a rocky outcrop. **The Herpetological Bulletin**, n. 120, 2012.

OKAMOTO, H.; AIZAWA, H. **Fear and anxiety regulation by conserved affective circuits** *Neuron* Cell Press, , 8 maio 2013.

OKUBO, R. et al. **Mechanisms underlying the effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on fear memory processing and their hypothetical effects on fear of cancer recurrence in cancer survivors** *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* Churchill Livingstone, , 1 abr. 2018.

PAPEZ, J. W. **Comparative neurology; a manual and text for the study of the nervous system of vertebrates**. New York: Crowell Company, 1929.

PASCUAL-LEONE, A. et al. **The plastic human brain cortex** *Annual Review of Neuroscience* Annual Reviews, , 2005.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. [s.l.] Academic Press Inc., 2006.

PERROT-SINAL, T. S. et al. Sexually dimorphic aspects of spontaneous activity in meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*): Effects of exposure to fox odor. **Behavioral Neuroscience**, v. 110, n. 5, p. 1126–1132, 1996.

PERUSINI, J. N.; FANSELOW, M. S. **Neurobehavioral perspectives on the distinction between fear and anxiety** *Learning and Memory* Cold Spring Harbor Laboratory Press, , 1 set. 2015.

PIMENTEL, H. D. C. **CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES NEUROMORFOLÓGICAS E PROLIFERATIVAS DO TELENCEFALO DO LAGARTO *Tropidurus hispidus***. [s.l.] Universidade Federal de Sergipe, 2014.

PIMENTEL, H. DE C. et al. Telencephalic distributions of doublecortin and glial fibrillary acidic protein suggest novel migratory pathways in adult lizards. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 112, p. 101901, 1 mar. 2021.

PISANSKY, M. T. et al. Oxytocin enhances observational fear in mice. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 1 dez. 2017.

PRADO, P. T. C.; BEL, E. A. DEL. c-fos, UM GENE DE ATIVAÇÃO IMEDIATA COMO MARCADOR NEURAL DE NOCICEPÇÃO. **Medicina (Ribeirão Preto)**.

Online), v. 31, n. 3, p. 424, 30 set. 1998.

PRIETO, A. S. Note on Parasites of the Tropical Lizard *Tropidurus hispidus*. **Journal of Herpetology**, v. 14, n. 2, p. 190, 6 jun. 1980.

REBOLA, N.; CARTA, M.; MULLE, C. **Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: Implications for memory encoding***Nature Reviews Neuroscience* Nature Publishing Group, , 1 abr. 2017.

REITER, S. et al. On the Value of Reptilian Brains to Map the Evolution of the Hippocampal Formation. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 90, n. 1, p. 41–52, 2017.

RIBEIRO, L. B. **Ecologia comportamental de *Tropidurus hispidus* e *Tropidurus semitaeniatus* (Squamata, Tropiduridae) em simpatria, em área de caatinga do nordeste do Brasil.** [s.l: s.n.].

SAINT-DIZIER, H. et al. Subdivisions of the arcopallium/posterior pallial amygdala complex are differentially involved in the control of fear behaviour in the Japanese quail. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 5, p. 288–295, 30 jun. 2009.

SALAS, C. et al. **Neuropsychology of learning and memory in teleost fish***Zebrafish*, 2006.

SANDERS, M. J.; WILTGEN, B. J.; FANSELOW, M. S. **The place of the hippocampus in fear conditioning***European Journal of Pharmacology* Elsevier, , 28 fev. 2003.

SANTOS, E. L. **PARTICIPAÇÃO DO CÓRTEX DORSAL REPTILIANO NOS PROCESSOS DE AQUISIÇÃO, CONSOLIDAÇÃO E EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA NO LAGARTO *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825).** [s.l.] Universidade Federal de Sergipe, 2018.

SANTOS, J. R. **Expressão de zif268 no cérebro do lagarto *Tropidurus Hispidus* após exploração de um ambiente enriquecido.** [s.l.] Universidade Federal de Sergipe, 2010.

SANTOS, L. DE G. **AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E**

NEUROBIOLÓGICA DA MEMÓRIA NO LAGARTO *Tropidurus hispidus* (SPIX, 1825; SQUAMATA: TROPIDURIDAE). [s.l: s.n.].

SATO, M. et al. The lateral parabrachial nucleus is actively involved in the acquisition of fear memory in mice. **Molecular Brain**, v. 8, n. 1, p. 22, 27 dez. 2015.

SAUVAGE, M.; KITSUKAWA, T.; ATUCHA, E. Single-cell memory trace imaging with immediate-early genes. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 326, p. 108368, 1 out. 2019.

SCHAFE, G. E.; DOYÈRE, V.; LEDOUX, J. E. Tracking the fear engram: The lateral amygdala is an essential locus of fear memory storage. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 43, p. 10010–10015, 26 out. 2005.

SCHWENK, K. Are geckos olfactory specialists? **Journal of Zoology**, v. 229, n. 2, p. 289–302, 1 fev. 1993.

SEYFARTH, R. M.; CHENEY, D. L.; MARLER, P. Monkey responses to three different alarm calls: Evidence of predator classification and semantic communication. **Science**, v. 210, n. 4471, p. 801–803, 14 nov. 1980.

SIMONE, J. J.; MALIVOIRE, B. L.; MCCORMICK, C. M. Effects of CB1 receptor agonism and antagonism on behavioral fear and physiological stress responses in adult intact, ovariectomized, and estradiol-replaced female rats. **Neuroscience**, v. 306, p. 123–137, 15 out. 2015.

SIQUEIRA, R. S. et al. Patterns of c-Fos expression in telencephalic areas of *Tropidurus hygomi* (Iguania: Tropiduridae) exposed to different social contexts. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 102, p. 101703, 2019.

SOTELO, M. I. et al. Telencephalic Neuronal Activation Associated with Spatial Memory in the Terrestrial Toad *Rhinella arenarum*: Participation of the Medial Pallium during Navigation by Geometry. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 88, n. 3–4, p. 149–160, 1 fev. 2017.

SRIVASTAVA, U. C.; MAURYA, R. C.; CHAND, P. Cyto-architecture and neuronal types of the dorsomedial cerebral cortex of the common Indian wall

lizard, *Hemidactylus flaviviridis*. **Archives Italiennes de Biologie**, v. 147, n. 1–2, p. 21–35, mar. 2009.

STEIMER, T. **The biology of fear- and anxiety-related behaviors** *Dialogues in Clinical Neuroscience* Les Laboratoires Servier, , 2002.

STRICK, P. L.; DUM, R. P.; FIEZ, J. A. **Cerebellum and nonmotor function** *Annual Review of Neuroscience Annual Reviews* , , 25 jun. 2009.

STRIEDTER, G. F. Evolution of the hippocampus in reptiles and birds. **Journal of Comparative Neurology**, v. 524, n. 3, p. 496–517, 2016.

TAKAHASHI, L. K.; CHAN, M. M.; PILAR, M. L. **Predator odor fear conditioning: Current perspectives and new directions** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, set. 2008.

TISCHMEYER, W.; GRIMM, R. **Activation of immediate early genes and memory formation** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1999.

VAN REENEN, C. G. et al. The benzodiazepine brotizolam reduces fear in calves exposed to a novel object test. **Physiology and Behavior**, v. 96, n. 2, p. 307–314, 16 fev. 2009.

VANZOLINI, P. E. .; RAMOS-COSTA, A. M. M. .; VITT, L. J. **Répteis das Caatingas**. Rio de Janeiro: [s.n.].

VARGAS, J. P.; LÓPEZ, J. C.; PORTAVELLA, M. What are the functions of fish brain pallium? **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 6, p. 436–440, 14 ago. 2009.

VITT, L. J.; ZANI, P. A.; CALDWELL, J. P. Behavioural ecology of *Tropidurus hispidus* on isolated rock outcrops in Amazonia. **Journal of Tropical Ecology**, v. 12, n. 1, p. 81–101, 1996.

WALTERS, E. T.; CAREW, T. J.; KANDEL, E. R. Associative learning in *Aplysia*: Evidence for conditioned fear in an invertebrate. **Science**, v. 211, n. 4481, p. 504–506, 1981.

WANG, H. et al. **cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia** *Frontiers in Molecular Neuroscience* Frontiers Media S.A., ,

30 ago. 2018.

WEI, F. et al. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase IV is required for fear memory. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 573–579, 13 maio 2002.

WIEDENMAYER, C. P. **Plasticity of defensive behavior and fear in early development** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* Pergamon, , 2009.

WOUTERLOOD, F. G. The structure of the mediodorsal cerebral cortex in the lizard *Agama agama*: A Golgi study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 196, n. 3, p. 443–458, 1981.

YANG, B. et al. Locus coeruleus anchors a trisynaptic circuit controlling fear-induced suppression of feeding. **Neuron**, v. 109, n. 5, p. 823- 838.e6, 3 jan. 2021.

ZANETTE, L. Y. et al. Predator-induced fear causes PTSD-like changes in the brains and behaviour of wild animals. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 11474, 7 dez. 2019.

ZANGENEHPOUR, S.; CHAUDHURI, A. Differential induction and decay curves of c-fos and zif268 revealed through dual activity maps. **Molecular Brain Research**, v. 109, n. 1–2, p. 221–225, 30 dez. 2002.

ZENKI, K. C. et al. Coriandrum sativum Extract Prevents Alarm Substance-Induced Fear- and Anxiety-Like Responses in Adult Zebrafish. **Zebrafish**, v. 17, n. 2, p. 120–130, 1 abr. 2020.

APÊNDICE 1: CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
 COORDENAÇÃO DE PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

CERTIFICADO
Prorrogação

Certificamos que a proposta intitulada "Distribuição e ativação de neurônios nitrérgicos em resposta à exposição do lagarto tropical *Tropidurus hispidus* a predadores: possível envolvimento de vias dopaminérgicas", registrada com o nº 26/2016, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Murilo Marchionni que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 12/07/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/10/2016, Término: 30/06/2020
Espécie/linhagem/raca	<i>Tropidurus hispidus</i>
Nº de animais	60
Peso/idade	1 ano
Sexo	Não informado
Origem	Laboratório de Neurofisiologia da UFS

Josemar SENA BATISTA

Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA
 Coordenador do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"
 Jardim Rosa Elze - São Cristóvão - SE
 49100-000
 Fones: 3212 6661/6605