FERNANDA ASSIS MORAES

**Utilização de glicocorticóides sintéticos para desencadear alterações
comportamentais semelhantes a transtorno de estresse pós- traumático
em ratos**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, para a obtenção
do título de mestre em
Ciências. Área de
concentração: Neurociência

Orientador: Prof. Dr. João
Pereira Leite

Co-orientador: Prof. Dr. Cleiton
Lopes Aguiar

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2019**

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

Ficha Catalográfica

MORAES, Fernanda Assis

Utilização de glicocorticóides sintéticos para desencadear alterações comportamentais semelhantes a transtorno de estresse pós- traumático em ratos

Fernanda Assis Moraes. Ribeirão Preto, 2019.
Orientador: João Pereira Leite

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Neurociências.

Nome: MORAES, Fernanda Assis

Título: Utilização de glicocorticóides sintéticos para desencadear alterações comportamentais semelhantes a transtorno de estresse pós- traumático em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências, área de
concentração: Neurociências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura:

Prof. Dr. _____ Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura:

Prof. Dr. _____ Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura:

Dedico à minha mãe, meus irmãos e avós maternos. Toda minha gratidão por tudo que fazem por mim, amo vocês incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. João Leite pela oportunidade oferecida de realizar minha pesquisa em seu laboratório, agradeço também a sua compreensão, presente em todos os momentos.

Ao professor Dr. Cleiton Lopes Aguiar pela co-orientação, e por tudo que sempre me ensinou desde a época da casa da ciência.

A todos os membros do laboratório de investigação em epilepsia, por toda a ajuda, suporte e ensino. Em especial ao Rafael por tudo que me ensinou, e a Ana Paula, por toda ajuda, suporte, paciência, e por tudo que fez por mim.

A nossa querida técnica Renata, por tudo desde sempre.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Utilização de glicocorticóides sintéticos para desencadear alterações comportamentais semelhantes a transtorno de estresse pós- traumático em ratos

RESUMO

Situações de estresse agudo são comuns no dia a dia e, geralmente, estão associadas a facilitação de processos de consolidação de memória. Porém, dependendo de sua intensidade, podem desencadear quadros neuropatológicos. Nesses casos, ocorre perda da discriminação de pistas que predizem a memória (generalização), além de prejuízo na evocação de memórias contextuais. Tais características são observadas no transtorno do estresse pós-traumático (TEPT), porém os seus mecanismos ainda são pouco compreendidos. O presente trabalho teve como objetivo testar se a injeção sistêmica de glicocorticoides sintéticos em ratos Wistar pode gerar alterações mnemônicas semelhantes ao TEPT. Especificamente, testamos se injeção sistêmica de corticosterona (2,5mg/kg) e dexametasona (2,5mg/kg) após a fase de condicionamento é suficiente para gerar prejuízos de formação de memória contextual e generalização da memória associada ao tom. Ratos Wistar adultos foram divididos em quatro grupos: *grupo pareado*, onde o choque foi apresentado em congruência com a apresentação do tom, sendo subdividido em *grupo controle* (salina) e *tratado* com glicocorticoide sintético (corticosterona ou dexametasona, dependendo do experimento) e *grupo não-pareado*, onde os estímulos tom e choque foram apresentados em momentos temporalmente distintos, sendo também divididos em controle e tratados. Os testes de retenção da memória foram realizados 24h após o condicionamento e repetidos depois de 7 dias. Nossos achados mostram que (i) o condicionamento aversivo ao tom é prejudicado por ambos tratamentos com corticosterona e dexametasona e (ii) os animais do grupo não-pareado tratados com dexametasona generalizam a resposta aversiva. Esses resultados replicam a característica de generalização da memória que ocorre em pacientes com TEPT e corroboram achados anteriores da literatura demonstrando que glicocorticoides em excesso são prejudiciais aos processos de consolidação da memória. Dessa forma, este trabalho abre novas possibilidades para estudos

adicionais envolvendo ratos Wistar que visem a um maior entendimento dos mecanismos responsáveis pela formação de memórias em situações patológicas como o TEPT.

Palavras-chave: Estresse, memória, medo, condicionamento aversivo, glicocorticoides.

Use of synthetic glucocorticoids to trigger behavioral changes similar to posttraumatic stress disorder in rats

ABSTRACT

Acute stress situations occur in everyday life and are often associated with facilitation of memory consolidation. However, neuropathological conditions may be triggered depending on their intensity. In such circumstances, cue discrimination to predict memory and the retrieval of contextual memories are impaired. Such characteristics are observed in posttraumatic stress disorder (PTSD), but their mechanisms are still poorly understood. The present study aimed to test whether systemic injection of synthetic glucocorticoids in Wistar rats can produce PTSD-like memories. Specifically, we tested whether systemic injection of corticosterone (2,5mg/kg) and dexamethasone (2,5mg/kg) after the conditioning phase is sufficient to cause impairment of contextual memory formation and generalization of the tone-associated memory. Adult Wistar rats were divided into four groups: paired group, where shock was presented congruently with tone presentation, subdivided into control group (saline) and treated with synthetic glucocorticoid (corticosterone or dexamethasone, depending on the experiment) and non-paired group where the tone and shock stimuli were presented at different moments, being also subdivided into control and treated. Memory retrieval tests were performed 24h after conditioning and repeated seven days later. Our findings show that (i) cued (tone) fear conditioning is impaired by both corticosterone and dexamethasone treatments and (ii) non-paired animals treated with dexamethasone had a generalization of the aversive response. These results reproduce the characteristic of memory generalization that occurs in PTSD patients and corroborates previous findings in the literature showing that excess of glucocorticoids is detrimental to memory consolidation. Thus, this study opens new avenues for further investigations involving Wistar rats aiming to further the understanding of the mechanisms responsible for the formation of memories in pathological situations such as PTSD.

Keywords: Stress, memory, fear, fear conditioning, glucocorticoids.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Caixa A - caixa na qual os animais foram habituados e testados para a memória ao tom.

FIGURA 2 - Caixa B - caixa na qual o animal é condicionado no dia do condicionamento e testado para a memória contextual no dia do teste.

FIGURA 3 - Visão geral experimento 1.

FIGURA 4 - Paradigma experimental - condicionamento para o grupo pareado.

FIGURA 5 - Paradigma experimental - condicionamento para o grupo não pareado.

FIGURA 6 - Caixa A - caixa na qual os animais foram habituados e testados para a memória ao tom.

FIGURA 7 - Caixa B - caixa na qual o animal é condicionado no dia do condicionamento e testado para a memória contextual no dia do teste.

FIGURA 8 – Visão geral experimento 2.

FIGURA 9 - Protocolo experimental para o grupo pareado.

FIGURA 10 - Protocolo experimental para o grupo não pareado.

Figura 11- Caixa A - caixa na qual os animais foram habituados e testados para a memória ao tom.

Figura 12- Caixa B - caixa na qual o animal é condicionado no dia do condicionamento e testado para a memória contextual no dia do teste.

FIGURA 13 - Visão geral experimento 3 – grupo pareado.

FIGURA 14 - Visão geral experimento 3 – grupo não pareado.

FIGURA 15 - Protocolo experimental para o grupo pareado experimento 3.

FIGURA 16 - Protocolo experimental para o grupo não pareado experimento 3.

FIGURA 17 - Taxa de congelamento do grupo pareado ao longo da sessão de teste realizado no contexto A (memória ao tom), 24h após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente inter-grupo. As letras “a” e “b” indicam a diferença intra grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS- tanto para “a”, quanto para “b”).

FIGURA 18 - Taxa de congelamento do grupo não pareado ao longo da sessão de teste realizado no contexto A (memória ao tom), 24h após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente inter grupo. A letra “a” indica a diferença intra grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS-).

FIGURA 19 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (26h após o condicionamento aversivo).

FIGURA 20 - Taxa de congelamento do grupo não pareado durante o teste realizado no contexto B, 2h após o teste no contexto A (26h após o condicionamento aversivo).

FIGURA 21 - Taxa de congelamento do grupo pareado ao longo da sessão de teste realizado no contexto A (memória ao tom), 7 dias após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente inter-grupo. A letra “a” indica a diferença intra grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS-).

FIGURA 22 - Taxa de congelamento do grupo não pareado ao longo da sessão de teste realizado no contexto A (memória ao tom), 7 dias após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente inter-grupo.

FIGURA 23 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A 7 dias após o condicionamento aversivo).

FIGURA 24 - Taxa de congelamento do grupo não pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (7 dias após o condicionamento aversivo).

FIGURA 25 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante teste realizado no contexto A (memória ao tom), 24h após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente inter-grupo. A letra “a” indica a diferença intra grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS-).

FIGURA 26 - Taxa de congelamento do grupo não pareado durante teste realizado no contexto A (memória ao tom), 24h após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente inter-grupo. As letras “a” e “b” indicam a diferença intra grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS- tanto para “a”, quanto para “b”)

FIGURA 27 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (26h após o condicionamento aversivo).

FIGURA 28 - Taxa de congelamento do grupo não pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (26h após o condicionamento aversivo).

FIGURA 29 – Taxa de congelamento do grupo pareado ao longo da sessão de teste realizado no contexto A (memória ao tom), 7 dias após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente inter-grupo. As letras “a” e “b” indicam a diferença intra grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS- tanto para “a”, quanto para “b”)

FIGURA 30 - Taxa de congelamento do grupo não pareado ao longo da sessão de teste realizado no contexto A (memória ao tom), 7 dias após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente inter-grupo. As letras “a” e “b” indicam a diferença intra grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS- tanto para “a”, quanto para “b”)

FIGURA 31 – Taxa de congelamento do grupo pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (24h após o condicionamento aversivo).

FIGURA 32 - Taxa de congelamento do grupo não pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (24h após o condicionamento aversivo).

FIGURA 33 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (7 dias após o condicionamento aversivo).

FIGURA 34 - Taxa de congelamento do grupo não pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (7 dias após o condicionamento aversivo).

FIGURA 35 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante teste realizado no contexto A (memória ao tom), 24h após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente inter grupo. As letras “a” e “b” indicam a diferença intra grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS- tanto para “a”, quanto para “b”).

FIGURA 36 – Taxa de congelamento do grupo não pareado durante teste realizado no contexto A (memória aversiva não contextual), 24h após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente inter grupo. As letras “a” indica a diferença intra grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS-).

FIGURA 37 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante teste realizado no contexto A (memória aversiva não contextual), 7 dias após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente inter grupo. As letras “a” e “b” indicam a diferença intra grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS- tanto para “a”, quanto para “b”), e a letra “c”, indica que CS+ é diferente de CS-.

FIGURA 38 - Taxa de congelamento do grupo não pareado durante teste realizado no contexto A (memória ao tom), 7 dias após o condicionamento

aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente inter grupo.

FIGURA 39 - Taxa de congelamento do grupo não pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (24h após o condicionamento aversivo). A linha com asterisco está sendo utilizada para descrever a diferença existente inter grupo.

FIGURA 40 - Taxa de congelamento do grupo não pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (24h após o condicionamento aversivo).

FIGURA 41 - Taxa de congelamento do grupo não pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (7 dias após o condicionamento aversivo).

FIGURA 42 - Taxa de congelamento do grupo não pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (7 dias após o condicionamento aversivo).

LISTA DE SIGLAS

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

CRH - hormônio liberador de corticotrofina

GRs - receptor glicocorticoides

HHA - hipotálamo-hipófise-adrenal

MRs - receptor mineralocorticoides

TEPT - transtorno do estresse pós-traumático

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	16
1.1 Memória	16
1.2- Memória aversiva, a importância do estudo em roedores	18
1.3 – Transtorno do estresse pós-traumático (TEPT)	18
1.4 - Modelos animais	19
1.5 - Modelos animais de TEPT	20
1.6 - Respostas fisiológicas ao estímulo aversivo	21
1.7 - Generalização da resposta aversiva	25
2- JUSTIFICATIVA	25
3- OBJETIVOS	26
4- METODOLOGIA	27
5- RESULTADOS	39
6- DISCUSSÃO	60
7- CONCLUSÃO	66
8- REFERÊNCIAS	66

1- INTRODUÇÃO

1.1 Memória

Kandel retrata a memória como a “cola” que mantém nossa vida mental unida. Para ele, sem esse poder unificador, tanto nossa vida consciente quanto inconsciente seria fragmentada, como se dividíssemos um dia todo em segundos. Nossa vida seria vazia e não teria sentido. Assim, distúrbios de memória podem afetar nossas capacidades cognitivas e, portanto, a nossa qualidade de vida em todas as fases da vida. Uma parcela significativa do nosso conhecimento sobre o mundo, e de nossas habilidades aprendidas, dependem de processos de aprendizagem ao longo da vida. Portanto, nós somos o que somos, em grande parte, devido ao que adquirimos, consolidamos, evocamos e esquecemos (Kandel et al, 2014). Diferentes regiões do encéfalo estão envolvidas no processo de armazenamento e evocação da memória. O córtex e o hipocampo, por exemplo, são áreas fundamentais, fato comprovado pela doença de Alzheimer. Em tal patologia, basicamente, essas duas áreas se encontram danificadas, o que leva o indivíduo a apresentar déficits de memória (Lent e colaboradores, 2002). Quando se trata de memórias emocionais, em relação aos substratos neurais, admite-se que o processo de formação dessas memórias recruta múltiplas regiões do encéfalo. Certas estruturas encontram-se mais ativadas que outras, dependendo do que efetivamente está sendo vivenciado. Por exemplo, a amígdala se encontra mais ativada durante situações aversivas (medo condicionado) enquanto que o hipocampo é mais ativado em tarefas envolvendo o uso de mapas espaciais e associações contextuais (Brandão, 2004).

Quanto a classificação, ela pode ser baseada no tempo que a informação fica retida: a memória ultrarrápida ou imediata que possui uma duração de segundos, a memória de curta duração que é retida por minutos a horas, e a memória de longa duração, que estabelece engramas duradouros por dias, semanas ou até mesmo anos (Lent et al, 2002). Além disso, as memórias podem decair ao longo do tempo, sendo esquecidas. O esquecimento é uma propriedade normal da memória, entretanto, alguns casos de esquecimento são patológicos. Existem quadros tanto de aumento das taxas de esquecimento quanto quadros onde o paciente apresenta

incapacidade de esquecer fatos irrelevantes. Na amnésia o indivíduo apresenta déficits acentuados de memória. Já na hipermnésia a grande capacidade de retenção de informações impede a separação entre aspectos relevantes e irrelevantes vivenciados (Lent et al, 2002).

A memória também pode ser classificada quanto a sua natureza. É denominada memória explícita (declarativa), para fatos e acontecimentos, pessoas, lugares e objetos; e memória implícita (não declarativa), para as habilidades motoras e perspectivas (Milner et al, 1998, Kandel et al, 2014). A diferença entre a memória implícita e a explícita, bem como as bases neuroanatômicas dessa distinção foram observadas pela primeira vez no paciente H.M. (Sapolsky, 2007). O caso de H.M. foi descrito por Brenda Milner, em 1957. Ele sofria de uma grave epilepsia, refratária ao tratamento medicamentoso e foi submetido a cirurgia. Foram removidas bilateralmente as estruturas mediais do lobo temporal (hipocampo, amígdala e partes da área associativa do córtex) (Kandel et al, 2014). Depois da cirurgia, as crises foram controladas, no entanto H.M. teve comprometimentos na formação de novas memórias explícitas (amnésia anterógrada), sugerindo que a atividade de estruturas do lobo temporal, especialmente o hipocampo, são fundamentais para a formação desse tipo de memória. Além disso, H.M. sofria de amnésia retrógrada parcial, restrita a última década anterior à cirurgia (Lent et al, 2002). Quanto a memória implícita, ele não apresentou déficits e continuou tendo habilidade de aprender, sugerindo que esse tipo de memória não depende da integridade do hipocampo, recrutando principalmente regiões como cerebelo, entre outras (Milner et al, 1998).

Sabe-se que os processos de codificação, armazenamento e evocação de informações são modulados por diversos fatores, como emoção, estresse, atenção, estímulos sensoriais, sono, alimentação, idade, além de distúrbios neurológicos, como esquizofrenia e epilepsia (McEwen et al, 1995, Elzinga e Bremner, 2002, Sandi e Pinelo-Nava, 2007). Dentre estes fatores, é de especial interesse a investigação dos mecanismos pelos quais o estresse e diferentes estados emocionais afetam a memória (Roosendaal e McGaugh, 2011).

1.2- Memória aversiva, a importância do estudo em roedores

Situações em torno de eventos ameaçadores são mais facilmente lembradas do que as que acompanham as neutras. A resposta aversiva para ambientes e pistas, bem como a capacidade para prever ameaças é um processo natural, importante para a adaptação, porque aumenta a probabilidade de sobrevivência dos seres vivos no seu habitat natural (Kaouane e colaboradores, 2012, Izquierdo e colaboradores, 2016). No entanto, a regulação atípica do medo frente a eventos estressantes pode provocar um grande impacto na memória, levando a ansiedade e medos excessivos associados a fobias e ao transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) (Quirk, 2017). Assim, a memória aversiva é a forma de memória mais bem estudada, especialmente em roedores (Izquierdo e colaboradores, 2016). A pesquisa com esses animais possibilitou a identificação dos mecanismos celulares e dos circuitos neurais envolvidos na regulação do medo (Quirk, 2017). Estudos com essa abordagem possibilitam aperfeiçoar os tratamentos clínicos já existentes para patologias psiquiátricas transtornos de ansiedade (Quirk, 2017).

1.3 – Transtorno do estresse pós-traumático (TEPT)

O TEPT é um transtorno psiquiátrico que pode ocorrer em pessoas que sofreram (direta ou indiretamente) ou testemunharam um evento traumático como um desastre natural, um acidente grave, um ato terrorista, guerra / combate, estupro ou outra agressão violenta (American Psychiatric Association, 2000). Caracteriza-se por três grupos de sintomas: 1) re-experiência: *flashbacks* ou pesadelos do evento traumático; 2) insensibilidade emocional e prevenção: perda de interesse, sentimentos de desapego, evitação de lembranças do evento traumático; e 3) hiperexcitação: vigilância excessiva e sobressalto exagerado (American Psychiatric Association, 2000). A hipermnésia para o acontecimento traumático está associada a um déficit de memória para as pistas contextuais peritraumáticas (Elzinga et al, 2002, Layton et al 2002). Porém, os mecanismos responsáveis pela distinção entre os estímulos ambientais ainda não estão completamente compreendidos (Calandreau et al, 2006).

1.4 - Modelos animais

O medo é uma das emoções básicas, e é desencadeado frente a ameaças ambientais reais. Situações nas quais há a possibilidade de uma ameaça existir, levam a uma sensação subjetiva, a ansiedade, que pode ser acompanhada por diversas alterações fisiológicas decorrentes da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), caracterizando uma resposta neuroendócrina ao estresse, que tais situações ocasionam (de Mello Cruz e Landeira-Fernandez, 2012, Graeff, 2007). Dessa forma, para que o medo e a ansiedade possam ser estudados, são utilizados modelos animais, os quais foram elaborados e padronizados desde as últimas décadas.

Em um ambiente controlado de laboratório, é possível estudar o medo aprendido em animais através da apresentação de estímulos que podem se tornar aversivos para eles. Um paradigma experimental comumente utilizado é o condicionamento aversivo, que possibilita a investigação de como os organismos são capazes de aprender a prever estímulos aversivos baseando-se em experiências anteriores (Ledux, 2000). Num típico paradigma de condicionamento aversivo, um estímulo neutro, tal como um tom, é pareado com um estímulo aversivo, como um choque nas patas (estímulo incondicionado), esse último gera respostas comportamentais mensuráveis (sobressalto, fuga, vocalizações, congelamento) e fisiológicas incondicionadas (ativação do sistema nervoso autônomo e secreção hormonal, entre outras). Depois de alguns pareamentos de tom e choque, o estímulo neutro é associado ao estímulo incondicionado (choque), de modo que a apresentação apenas do tom (estímulo condicionado) é capaz de promover respostas fisiológicas e comportamentais citadas anteriormente (Koenigs and Grafman, 2009).

O condicionamento aversivo ao contexto é outra opção para o estudo dos mecanismos envolvidos no processo de aprendizagem e memória, bem como para a compreensão e possível tratamento do medo, no TEPT. Nesse paradigma, os animais formam uma memória aversiva ao contexto em que se encontravam no momento em que receberam o choque. Uma reexposição ao contexto, dessa vez na ausência do estímulo incondicionado, fará com que o animal apresente respostas de medo (Yokoyama, 2016).

1.5 - Modelos animais de TEPT

Alguns dos sintomas do TEPT podem ser replicados através de testes comportamentais em animais. Isso é possível, devido às semelhanças dos circuitos neurais relacionados ao medo e a ansiedade, que foram conservados em roedores e humanos ao longo da evolução. Tais circuitos são essenciais para a investigação da etiologia do TEPT. Assim, os modelos animais para TEPT possibilitam que haja uma maior compreensão a respeito da etiologia do transtorno a nível neurofisiológico, bem como o estudo de novas drogas para o tratamento dos pacientes que apresentem tal patologia (Flandreau e Toth, 2017), uma vez que a pesquisa clínica com pessoas é dificultada, devido a questões éticas que não permitem expor voluntários a eventos traumáticos (Liberzon e Young, 2005). Já com os modelos animais, é possível fazer a manipulação de todos os parâmetros necessários para provocar o trauma (intensidade, tipo e duração do estímulo estressor) (Goswami e colaboradores, 2013).

Há uma grande diversidade de modelos animais para o estudo do TEPT, permitindo investigar os mecanismos responsáveis pela formação de memórias aversivas e os circuitos neurais envolvidos no seu processamento. Existem alguns critérios que somados podem validar os modelos experimentais de TEPT: 1) o modelo deve reproduzir os sintomas que se manifestam nos humanos, 2) o modelo deve ser capaz de mensurar as emoções dos animais como, por exemplo, o medo e a ansiedade, 3) o modelo deve prever o tratamento dos sintomas que são observados em humanos, 4) o modelo deve diferenciar os indivíduos que apresentam o TEPT dos que não apresentam. Esses modelos expõem os animais a diferentes estímulos estressores, e permitem que ocorram mudanças de longo prazo nos níveis de corticosteroides circulantes, além de alterações no comportamento dos animais. Os agentes estressores podem ser controlados de diversas formas, por exemplo, serem apresentados uma vez só ou mais de uma, podem ser agudos ou crônicos, controláveis ou incontrolláveis. Os modelos também se enquadram em duas categorias, estressores físicos ou estressores sociais e estressores psicológicos (Flandreau e Toth, 2017, Goswami, 2013).

Os estressores físicos podem ser divididos em: (1) estresse de imobilização ou restrição: nesse modelo o animal é colocado em um aparato (o tempo no aparato varia de 2-6h) que restringe seus movimentos parcial ou totalmente (nesse caso o estresse causado é mais severo (Flandreau e Toth, 2016, Watanabe, 2018) (2) exploração

subaquática: os animais são submetidos ao nado forçado por 40 minutos e, depois, a submersão por 20 minutos (Flandreau e Toth, 2016, Watanabe, 2018) (3) estresse prolongado: em tal paradigma três fatores estressores estão envolvidos, imobilização, nado forçado e anestesia com éter. Um dos protocolos experimentais de estresse prolongado consiste em 2 horas de imobilização, depois 20 minutos de nado forçado, e por fim, perda de consciência induzida por éter (Flandreau e Toth, 2017); (4) choque elétrico: um choque elétrico é pareado a um contexto ou a outro estímulo neutro, como o tom; um exemplo desse tipo de paradigma, é o condicionamento aversivo, que foi escolhido para o presente estudo (Flandreau e Toth, 2016, Watanabe, 2018).

Em relação aos estressores sociais e psicológicos, têm-se os seguintes modelos: (1) estresse de derrota social: o animal é colocado no mesmo aparato que um segundo animal mais velho e agressivo (dominante do contexto), ou seja, uma exposição direta. Após algumas reexposições o animal exposto passa a apresentar sintomas de ansiedade e TEPT. Uma variação do modelo, consiste em expor indiretamente o animal ao animal dominante por 6h, nesse tempo aleatoriamente ocorrem até 3 exposições diretas com a duração de 1 minuto (Flandreau e Toth, 2016, Watanabe, 2018); (2) estresse do predador: em tal paradigma o rato é exposto ao seu predador natural (gato), ou ao o cheiro dele (Flandreau e Toth, 2016, Watanabe, 2018).

1.6 - Respostas fisiológicas ao estímulo aversivo

Os organismos estão sujeitos a situações estressantes. Estas podem ser o gatilho necessário para que algumas respostas fisiológicas sejam desencadeadas. Dentre elas, pode-se citar o aumento da pressão arterial, do batimento cardíaco e da frequência respiratória. Tais respostas são importantes para a sobrevivência frente a estímulos que possam ser uma ameaça a vida (resposta de luta ou fuga) (Finsterwald and Alberini, 2014). Essas respostas também são fundamentais para a adaptação dos organismos frente a possíveis mudanças ambientais (Finsterwald e Alberini, 2014).

Não são só as respostas fisiológicas imediatas que são importantes para a sobrevivência. A informação aprendida e a capacidade de lembrar que algo é aversivo e pode colocar a vida em risco também é necessária para que o organismo se proteja ao se deparar novamente com ameaças similares as já vivenciadas (Finsterwald e Alberini,

2014). Assim, em longo prazo, o estresse ocasiona mudanças no sistema nervoso central, e essas mudanças contribuem para que o organismo seja capaz de armazenar informações a cerca do evento ameaçador, ou seja, o estresse é um potente modulador de processos de aprendizagem e memória. Por exemplo, quando o encéfalo detecta um estímulo aversivo, ocorrem mudanças nos níveis de alerta e nas funções cognitivas, como a atenção e processamento da memória, e no restante do corpo, respostas endócrinas, autônomas e musculoesqueléticas (Kandel et al, 2014). Dessa forma, os estressores de leves a moderados (de curta duração) melhoram a memória, pois o estresse faz com que haja mais energia disponível aos neurônios. Assim, há uma melhora na consolidação e na evocação da memória (Sapolsky, 2007). Também levam a uma elevação na concentração de glicocorticoides no hipocampo, o que facilita a potenciação da memória de longo prazo (Sapolsky, 2007). No entanto, quando os estressores se tornam intensos ou prolongados, pode haver prejuízos na memória dependente do hipocampo (Sapolsky, 2007). Quando as concentrações de glicocorticoides passam de leves a moderadas para concentrações muito elevadas (característica de situações de estresse máximo), tais hormônios não auxiliam mais a potenciação de longo prazo (Sapolsky, 2007). Situações de exposição crônica aos glicocorticoides, ocasionada por longos períodos vivenciando eventos estressores, podem causar modificações moleculares e morfológicas, através de mecanismos genômicos e não genômicos em áreas encefálicas que se relacionam a cognição e emoção (Monsey e colaboradores, 2014).

Nas situações de estresse crônico, a amígdala, que se projeta ao hipocampo encontra-se muito ativada, o que faz com que as funções do hipocampo sejam ainda mais prejudicadas (Sapolsky, 2007). Há também uma “desconexão” entre as redes neurais, fato que pode explicar porque há déficits de memória no período de estresse crônico. As conexões podem se reestabelecer quando os níveis de estresse ideal são retornados. No entanto, quando a exposição ao estresse ou aos glicocorticoides é muito prolongada, pode ocorrer a morte de neurônios hipocampais (Sapolsky, 2007).

Os glicocorticoides são hormônios esteroides sintetizados a partir do colesterol nas glândulas adrenais, e são fundamentais para restaurar a homeostase após exposição ao estresse. Também modulam respostas fisiológicas importantes, como a glicogenólise, resposta imune e memórias (Finsterwald e Alberini, 2014). Sua secreção atinge os níveis máximos de concentração na corrente sanguínea após situações estressantes (Drexler e Wolf, 2017). Quando atravessam a barreira hematoencefálica, pelo fato de apresentarem

propriedades lipoproteicas, os glicocorticoides conseguem atravessar também a membrana plasmática das células e assim ativar receptores intracelulares em regiões encefálicas específicas como, hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal. Essas regiões de ação dos glicocorticoides além de serem críticas para a mediação dos efeitos do estresse são importantes para a codificação, o processamento e a retenção de informações a cerca de eventos emocionais, (Finsterwald e Alberini, 2014, Carmen Sandi et al 2007, Mateo e colaboradores, 2008).

Uma das mudanças que ocorrem no organismo a nível sistêmico em resposta a situações estressantes, é a ativação do eixo HHA (hipotálamo-hipófise-adrenal). Ele é responsável pela manutenção do equilíbrio do meio interno (homeostase) frente a situações estressantes (Finsterwald e Alberini, 2014). Quando ativado, promove a liberação de glicocorticoides. No que diz respeito ao funcionamento do eixo HHA, primeiro ocorre a liberação de hormônio liberador da corticotrofina (CRH, sigla do inglês: corticotropin-releasing hormone) pelo hipotálamo. Após liberado, ele é conduzido até a hipófise anterior, estimulando a secreção de um segundo hormônio, o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, sigla do inglês: adrenocorticotrophic hormone). Este, por sua vez, é transportado até a glândula adrenal que é a responsável pela produção e secreção de vários outros hormônios, entre eles o hormônio do estresse (cortisol em humanos, corticosterona em roedores). Um mecanismo de *feedback* negativo controla a regulação do eixo HHA quando ocorre um aumento dos níveis de cortisol/corticosterona circulantes (Vilela e Jurueña, 2014). Sabe-se que a síntese de glicocorticoides ocorre durante o dia, é observado que as concentrações circulantes de cortisol têm seu pico pela manhã, e vão diminuindo até o período noturno, onde são mais baixas, seguindo um padrão de oscilação circadiana, ou seja, sua liberação ocorre de acordo com as demandas fisiológicas durante o dia, visando a homeostase. A não ser em situações de estresse, por exemplo, em que há uma liberação maior de forma a promover um desequilíbrio homeostático (Ramamoorthy e Cidlowski, 2017).

Em relação aos receptores para glicocorticoides, podem ser de dois tipos: glicocorticoides (GRs) e mineralocorticoides (MRs). São expressos por todo o encéfalo, tanto nos neurônios quanto nas células gliais, no entanto observa-se uma maior expressão nas duas regiões mais importantes para a memória aversiva e experiências traumáticas, o hipocampo e a amígdala (Finsterwald e Alberini, 2014). Esses receptores também são expressos no citosol, na membrana celular e nas mitocôndrias, e podem

ocasionar alterações na função neuronal, por meio da modulação de alguns processos (entre eles, liberação de aminoácidos excitatórios), pois quando ocorre a liberação de corticosterona, os receptores localizados no citosol se movem para o núcleo da célula e então, podem exercer a função de fator de transcrição, e dessa forma podem alterar a expressão gênica. Além de poderem ocasionar alterações na expressão gênica, os glicocorticoides também podem interagir com uma série de sistemas neuroquímicos, e dessa forma, ocasionar alterações comportamentais (como o freezing, por exemplo) (Gray e colaboradores, 2017). Alguns estudos demonstraram que os GRs quando ativados pelo estresse podem ocasionar uma potencialização na consolidação da memória para situações estressantes, visto que os glicocorticoides atuam através de modificações em atividades moleculares, como por exemplo, sinalização intra e extracelular e na plasticidade do hipocampo.

Através de estudos experimentais com animais foi possível estabelecer que a administração de corticosterona leva a um aumento na consolidação da memória após a aquisição da mesma, além de ocasionar déficits quando a administração ocorrer antes da evocação ou durante o aprendizado relacionado a memórias de curto prazo (De Quervain e colaboradores, 2016, Finsterwald e Alberini, 2014). Dagnino-Subiabre e colaboradores, em 2012, em seu estudo demonstraram que a corticosterona diminuiu as respostas condicionadas auditivas em comparação ao grupo controle. Marks e colaboradores, 2015 demonstraram que os animais que receberam altas doses de corticosterona, congelaram significativamente mais do que animais do grupo controle tanto quando testados para memória contextual quanto para memória ao tom. Ou seja, a corticosterona apresenta um efeito dose dependente na recuperação da memória.

Outro glicocorticoide sintético, que pode ser utilizado para o estudo da memória, é dexametasona, visto que ela apresenta uma maior afinidade pelos GRs do que pelos MRs, e os GRs podem mediar os efeitos dos glicocorticoides sobre o processo de aprendizagem e memória (Kuen-Jer e colaboradores, 2016). Cavali e colaboradores, 2017 demonstraram que os animais que receberam dexametasona antes de serem testados para a associação de um estímulo condicionado ao contexto, tiveram uma redução na expressão de respostas aversivas para esse estímulo, porém não houve um prejuízo na associação do estímulo ao contexto.

1.7 - Generalização da resposta aversiva

Cada indivíduo vivencia as experiências de maneiras diferentes, no entanto, quando ocorre um evento traumático, geralmente o contexto passa a ser como um estímulo condicionado. Assim, a tendência é que no futuro, ao se vivenciar uma situação semelhante a aquelas vivida anteriormente, haja uma projeção do medo. Ou seja, na generalização um contexto semelhante ao que já desencadeou o medo anteriormente, também pode desencadear respostas aversivas (Asok e colaboradores, 2019, Huckl eberry e colaboradores).

Da mesma forma que a alguns processos relacionados a memória são modulados por vários fatores (ciclo circadiano, genética, fatores ambientais, estresse precoce, etc) a generalização também. A generalização é um aspecto importante para as manifestações comportamentais. A capacidade que animais possuem de generalizar a memória permite adaptação a mudanças ambientais. No entanto, essa capacidade pode ser prejudicial, quando demasiada, podendo levar ao desenvolvimento de respostas não adaptativas como nos transtornos de ansiedade e TEPT. Assim, é necessário que haja um balanço entre a discriminação contextual e a generalização (Asok e colaboradores, 2019, Yokoyama e colaboradores 2016).

A identificação dos mecanismos envolvidos no processo de generalização da memória pode auxiliar na compreensão do TEPT, bem como na compreensão das bases neurais da generalização das respostas aversivas. Os mecanismos neurais relacionados ao processo de generalização do medo ainda precisam ser melhor compreendidos. O que se sabe é que a amígdala, córtex pré-frontal, o hipocampo e de áreas talâmicas são importantes para a generalização do medo. A neurotransmissão excitatória e inibitória nas regiões supracitadas também influencia nesse processo.

2 - JUSTIFICATIVA

A intenção do presente trabalho foi desenvolver um modelo experimental para o estudo do transtorno do estresse pós-traumático em ratos, baseado na investigação realizada anteriormente por Kaouane e colaboradores (2012) com camundongos. Em seguida, testamos como a modulação farmacológica com glicocorticoides sintéticos (corticosterona ou dexametasona) poderia influenciar na memória aversiva aprendida no

condicionamento aversivo. Nossa hipótese é que os animais do grupo pareado (tom seguido do choque) fizessem a associação do preditor correto (tom) com o choque, em um contexto diferente de onde foram condicionados (contexto A) e dessa forma, aumentassem a resposta aversiva, que seria observada através do aumento da taxa de congelamento após a apresentação do tom. Também se esperava que os animais do grupo não pareado (tom e choque separados temporalmente), quando recebessem injeção de corticosterona ou dexametasona, 1) generalizassem a resposta aversiva (aumento da taxa de congelamento) quando testados num contexto onde não receberam o estímulo incondicionado (choque) – contexto A, 2) apresentassem déficits de memória (diminuição da taxa de congelamento) quando testados no contexto onde receberam o choque – contexto B. Levando-se em conta a prevalência de pessoas com TEPT ,5-10% da população (Yehuda e colaboradores, 2015), e as dificuldades encontradas para o tratamento dos pacientes acometidos, é de extrema importância o melhor entendimento das bases neurobiológicas do transtorno para que futuramente haja um tratamento eficiente para a melhoria na qualidade de vida dos pacientes. Por meio dos modelos animais, é possível uma melhor compreensão da neurobiologia do TEPT, investigando possíveis mecanismos pelos quais um evento aversivo torna-se algo traumático.

3 - OBJETIVOS

Geral:

Testar se a injeção sistêmica de glicocorticoides sintéticos em ratos Wistar pode gerar alterações mnemônicas semelhantes ao TEPT.

Específicos:

Avaliar se animais que passaram pelo protocolo de pareamento entre tom e choque formariam uma memória associativa entre os dois estímulos, caracterizando um protocolo de condicionamento aversivo ao tom.

Investigar se a injeção de corticosterona ou dexametasona aumentaria as respostas de medo nos animais que passaram pelo protocolo de pareamento entre o tom e o choque.

Desenvolver um protocolo de condicionamento onde a apresentação não-congruente entre os estímulos tom e choque fosse capaz de formar uma memória associativa apenas ao contexto, caracterizando um protocolo de condicionamento aversivo ao contexto.

Investigar se a injeção de corticosterona ou dexametasona em animais que passaram pelo protocolo não-pareado seria capaz de generalizar a memória, de maneira que os animais passassem a responder ao estímulo não-preditor (tom), replicando uma das características do TEPT.

Avaliar se a injeção de corticosterona ou dexametasona em animais que passaram pelo protocolo não-pareado seria capaz de causar um déficit da memória contextual, de maneira que os animais passassem a responder menos ao estímulo preditor (contexto), replicando outra das características do TEPT.

4 - METODOLOGIA

Para todos os experimentos foram utilizados Ratos wistar machos com pesos entre 250 e 320 g, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – USP/RP (experimentos 1 e 2) e do ANILAB (experimento 3). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (40 x 33 x 18 cm; quatro animais por caixa) contendo raspas de madeira (maravalha) sobre o assoalho. Durante todo o período dos experimentos, os animais ficaram alojados no biotério, com temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ \text{C}$), e foram submetidos a um ciclo de 12 h de claro: 12 h de escuro com luzes acesas às 07h00min. Não houve restrições alimentar e de água. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento e estresse destes. Todos os protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CETEA - FMRP – USP). O presente trabalho foi aprovado pelo CETEA 0102/2018).

Experimento 1

Nesse experimento foram utilizados 64 ratos Wistar, dos quais 32 compunham o grupo controle (DMSO + Salina), 16 animais do subgrupo pareado, e 16 animais subgrupo não-pareado, e 32 o grupo tratado (DMSO + corticosterona), 16 animais subgrupo pareado, e 16 animais subgrupo não-pareado.

No 1° dia e no 2° dia de experimento, todos os animais foram habituados individualmente na caixa A (**FIGURA 1**), sem estímulos, por 5 minutos. Ela apresentava intensidade luminosa de 100lux, o chão foi forrado por raspas de madeira (maravalha no assoalho), pistas visuais (quadrados de cartolina preta nas paredes do fundo e de um dos lados), e foi limpa com ácido acético (0,5%) antes que cada um dos animais fosse colocado individualmente na mesma. No 3° dia, os animais foram condicionados individualmente na caixa B (**FIGURA 2**), intensidade luminosa 60 lux, durante 10 minutos. Os animais receberam dois sinais de tom (65 dB, 12 s) e dois choques nas patas (0,8 mA, 3 s). O momento em que os choques foram aplicados diferiram entre os grupos de animais pareado e não-pareado. No grupo pareado (tom seguido do choque), os animais receberam dois pareamentos tom-choque com um intervalo de 60 s entre eles. Nesse caso, o choque foi aplicado imediatamente após o final da apresentação tom (**FIGURA 4**). No grupo não-pareado (choque e tom separados temporalmente), os animais receberam um choque e depois de um atraso de 20 s, um tom. Em seguida, houve um atraso de 30 s, antes de receberem o tom. Após um intervalo de 30 s, receberam novamente o choque (**FIGURA 5**). Imediatamente após o condicionamento, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de salina + DMSO (grupo controle) ou de corticosterona + DMSO (grupo tratado) 2,5mg/kg.

Vinte e quatro horas após o condicionamento (4° dia) todos os animais foram submetidos a dois testes de retenção de memória. No primeiro teste, os animais foram reexpostos ao contexto A (memória ao tom) durante 6 minutos, sendo o tom apresentado continuamente durante o terceiro e o quarto minuto. Duas horas depois, foram reexpostos ao contexto B (memória contextual) durante 6 minutos, sem a apresentação do tom. Uma semana após o teste de retenção de memória (11° dia de experimento), os testes foram repetidos. Os animais foram filmados, para a verificação do tempo de congelamento (freezing), que foi utilizado para quantificar a memória dos animais. A resposta de congelamento foi calculada como a percentagem do tempo total da sessão de teste.

FIGURA 1 - Caixa A – caixa na qual os animais foram habituados e testados para a memória ao tom.

FIGURA 2 - Caixa B – caixa na qual o animal é condicionado no dia do condicionamento e testado para a memória contextual no dia do teste.

FIGURA 3 - Visão geral experimento 1- Ver descrição na metodologia.

FIGURA 4 - Paradigma experimental - condicionamento para o grupo pareado.

FIGURA 5 - Paradigma experimental - condicionamento para o grupo não-pareado.

Experimento 2

Esse experimento foi realizado com 64 ratos Wistar, dos quais 32 compunham o grupo controle (DMSO + Salina), 16 animais do subgrupo pareado, e 16 animais subgrupo não-pareado, e 32 o grupo tratado (DMSO + corticosterona), 16 animais subgrupo pareado, e 16 animais subgrupo não-pareado.

No 1º dia, todos os animais foram habituados individualmente na caixa A (**FIGURA 6**), sem estímulos por 5 minutos. Ela apresentava intensidade luminosa de 100lux, em seu interior havia um losango de acrílico preto, e foi limpa antes que cada um dos animais fosse colocado individualmente, com ácido acético (0,5%). O mesmo ocorreu no 2º dia, tanto para o grupo pareado quanto para o grupo não-pareado.

No 3º dia, os animais foram condicionados individualmente na caixa B (**FIGURA 7**), intensidade luminosa 60 lux, durante onze minutos. Os animais do grupo pareado receberam três sinais de tom (65 dB, 12 s) e três choques nas patas (0,8 mA, 3s). O choque foi dado imediatamente após o final da apresentação tom (**FIGURA 9**). Para o grupo não-pareado três choques nas patas (0,8 mA, 3s) de maneira não pareada com as apresentações dos três tons, conforme representado na **FIGURA 10**. Imediatamente após o condicionamento, os animais de ambos os grupo receberam uma injeção intraperitoneal de salina + DMSO (grupo controle) ou de corticosterona + DMSO (grupo tratado) 2,5mg/kg. Vinte e quatro horas após o condicionamento (4º dia) todos os animais foram submetidos a dois testes de

retenção de memória. No primeiro teste, os animais foram reexpostos ao contexto A (memória ao tom) durante 6 minutos, sendo o tom apresentado continuamente durante o terceiro e o quarto minuto. Duas horas depois, foram reexpostos ao contexto B (memória contextual) durante 6 minutos, sem a apresentação do tom. Uma semana após o teste de retenção de memória (11º dia), os animais foram testados novamente. Os animais foram filmados, para a verificação do tempo de congelamento (freezing), que foi utilizado para quantificar a memória dos animais. A resposta de congelamento foi calculada como a porcentagem do tempo total de congelamento.

FIGURA 6 - Caixa A – caixa na qual os animais foram habituados e testados para a memória ao tom.

FIGURA 7 - Caixa B - caixa na qual o animal é condicionado no dia do condicionamento e testado para a memória contextual no dia do teste.

FIGURA 8 –Visão geral experimento 2 – Ver descrição na metodologia

FIGURA 9 - Protocolo experimental para o grupo pareado

FIGURA 10 - Protocolo experimental para o grupo não- pareado

Experimento 3

Esse experimento foi realizado com quarenta e oito ratos Wistar Hannover, dos quais vinte e quatro compunham o grupo controle (salina), (doze animais do subgrupo pareado, e doze animais subgrupo não-pareado), e vinte e quatro o grupo tratado (dexametasona), (doze animais subgrupo pareado, e doze animais subgrupo não-pareado).

No 1º dia, os animais tanto do grupo controle quanto do grupo tratado foram habituados individualmente na caixa A (**Figura 11**), a qual apresentava em seu interior um losango de acrílico preto, com intensidade luminosa de 100lux, por cinco minutos sem a apresentação de estímulos. A caixa foi limpa com ácido acético (0,5%), antes que cada um dos animais fosse colocado individualmente na mesma. No 2º dia, os animais do grupo pareado (tom seguido de choque) foram habituados no contexto B (**Figura 12**), enquanto os animais do grupo não-pareado (tom e choque separados temporalmente) foram expostos ao tom na caixa B. O condicionamento durou onze minutos e os animais receberam três sinais de tom (65 dB, 12 s) (**Figura 16**)

No 3º dia, os animais do grupo pareado foram condicionados individualmente na caixa B, intensidade luminosa 60 lux, durante onze minutos. Os animais receberam três sinais de tom (65 dB, 12 s) e três choques nas patas (0,8 mA, 3s). O choque foi dado imediatamente

após o final da apresentação tom (**Figura 15**). O grupo não-pareado foi condicionado ao choque nessa mesma caixa. O condicionamento durou onze minutos e os animais receberam choques nas patas (0,8 mA, 3s) (**Figura 16**). O grupo experimental recebeu dexametasona (2,5 mg/ml/kg, i.p.) imediatamente após o condicionamento. Já o grupo controle recebeu o mesmo volume de solução de Salina (0,9%) + Dimetilsulfóxido (DMSO) (5%).

Vinte e quatro horas após o condicionamento (4° dia) todos os animais foram submetidos a dois testes de retenção de memória. No primeiro, os animais foram reexpostos ao contexto seguro durante seis minutos, dos quais apenas no terceiro e no quarto foi apresentado o tom. Duas horas depois, foram reexpostos ao contexto B durante seis minutos, sem tom. Uma semana após o teste de retenção de memória (11° dia), os animais foram testados novamente. Os animais foram filmados, para a verificação do tempo de congelamento (freezing), que foi utilizado como uma forma de análise da resposta ao medo condicionado. A resposta de congelamento foi calculada como a percentagem do tempo total de congelamento.

Figura 11- Caixa A – caixa na qual os animais foram habituados e testados para a memória ao tom.

Figura 12- Caixa B - caixa na qual o animal é condicionado no dia do condicionamento e testado para a memória contextual no dia do teste.

FIGURA 13 - Visão geral experimento 3 – grupo pareado – ver descrição na metodologia.

FIGURA 14 - Visão geral experimento 3 – grupo não- pareado - ver descrição na metodologia.

FIGURA 15 - Protocolo experimental para o grupo pareado experimento 3

FIGURA 16 - Protocolo experimental para o grupo não- pareado experimento 3

Quantificação do tempo de congelamento e Análise dos dados

Os animais foram filmados durante a tarefa comportamental, e os vídeos foram analisados minuto a minuto para verificar o tempo de congelamento do animal, que foi utilizado como medida de memória aos contextos os quais eles foram expostos. A resposta de congelamento foi expressa em porcentagem do tempo total da sessão de teste. Quando os animais foram testados no contexto B a porcentagem calculada foi relativa ao tempo total da sessão experimental. Quando os animais foram testados no contexto A, a porcentagem de congelamento foi expressa durante três fases: (i) dois minutos iniciais de linha de base, (ii)

dois minutos intermediários de apresentação do tom e (iii) dois minutos finais, após a apresentação do tom. Para análise estatística, quando testados no contexto A utilizou-se o teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas, considerando como fatores principais tratamento e tempo e o teste de Tukey como complementar à ANOVA; quando os animais foram testados no contexto B foi utilizado o teste t não- pareado para amostras independentes.

5. RESULTADOS

Os resultados descritos a seguir, dizem respeito ao experimento-piloto realizado

A **FIGURA 17** sintetiza os resultados experimentais referentes ao teste de retenção de memória ao tom do grupo pareado, realizado no contexto A, 24 horas após o condicionamento aversivo. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas, evidenciou que existem diferenças significativas quanto aos fatores (1) tempo ($F_{(2, 90)} = 5,04$, $P=0,0084$), (2) tratamento ($F_{(1, 90)} = 6,49$, $P=0,0125$) e (3) interação entre os fatores tempo x tratamento ($F_{(2, 90)} = 5,04$, $P=0,0084$). O teste complementar de Tukey evidenciou um aumento da taxa de congelamento quando comparadas (1) a linha de base (Baseline) do grupo salina com o período onde foi apresentado o estímulo condicionado (do inglês, conditioned stimuli CS+, assim representado nos gráficos) ($P < 0,0001$); da mesma forma, os animais que receberam corticosterona após o treino apresentaram um aumento das taxas de congelamento quando foi apresentado o tom (CS+), se comparado à linha de base ($P < 0,0001$). Como esperado, isso indica que a taxa de congelamento dos animais aumenta com a apresentação tom, independentemente do tratamento farmacológico que eles receberam após o treino (salina ou corticosterona). Além disso, as taxas de congelamento se mantiveram elevadas em ambos os grupos nos dois minutos após o término da apresentação do estímulo condicionado: (3) linha de base do grupo salina vs. CS- ($P < 0,0001$), (4) linha de base do grupo cortico vs. CS- ($P = 0,0043$).

FIGURA 17 - Taxa de congelamento do grupo pareado ao longo da sessão de teste realizado no contexto A (memória ao tom), 24h após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente entre grupos. As letras “a” e “b” indicam a diferença intra-grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS- tanto para “a”, quanto para “b”).

Na **FIGURA 18**, têm-se os resultados experimentais referentes ao teste realizado no contexto A, 24h após o condicionamento para o grupo não-pareado. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas evidenciou que ambos os grupos variaram ao longo do tempo ($F_{(2,84)} = 11,18$, $P < 0,0001$), mas não foram observadas diferenças significativas nos fatores tratamento ($F_{(2,66)} = 0,3343$, $P = 0,7171$) e interação entre os fatores ($F_{(1,66)} = 2,936$, $P = 0,0913$).

FIGURA 18 - Taxa de congelamento do grupo não-pareado ao longo da sessão de teste realizado no contexto A (memória ao tom), 24h após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente entre grupos. A letra “a” indica a diferença intra-grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS-).

Em relação ao contexto B (**FIGURA19**), que avalia a retenção de memória contextual, o teste t para amostras independentes demonstrou não haver diferença nas taxas de congelamento quando os animais do grupo pareado (salina ou cortico) foram testados nesse contexto ($t_{(30)} = 0,7981$, $P = 0,4311$), ou seja, a corticosterona não influenciou o comportamento dos animais; era esperado que os animais tratados com a cortico apresentassem déficits de memória ao contexto onde foram condicionados, ou seja, que houvesse uma diminuição da taxa de congelamento.

FIGURA 19 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (26h após o condicionamento aversivo).

Em relação ao grupo não-pareado (**FIGURA 20**), o teste t para amostras independentes demonstrou não haver diferenças entre os grupos salina x cortico ($t_{(28)} = 0,4736$, $P = 0,6395$), quando os animais foram testados no contexto B, indicando mais uma vez que a corticosterona não influenciou no comportamento dos animais.

FIGURA 20 - Taxa de congelamento do grupo não-pareado durante o teste realizado no contexto B, 2h após o teste no contexto A (26h após o condicionamento aversivo).

Sete dias após o condicionamento, os animais foram testados novamente no contexto A, e duas horas após, no contexto B. A finalidade desse teste foi verificar a manutenção da memória ao longo do tempo.

Quando os animais grupo pareado foram testados no contexto A (**FIGURA 21**), o teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas, evidenciou diferenças significativas quanto aos fatores (1) tempo ($F_{(2, 90)} = 14,54$, $P < 0,0001$) e (2) tratamento ($F_{(1, 90)} = 16,19$, $P = 0,0001$), mas não em relação a interação entre os fatores ($F_{(2, 90)} = 2,803$, $P = 0,0659$). O teste complementar de Tukey evidenciou diferenças significativas entre a (1) linha de base do grupo salina vs. CS+ ($P < 0,0001$), indicando que a taxa de congelamento aumentou após a apresentação do tom. Também foi evidenciado que a (2) linha de base do grupo Salina é diferente do período após o término da apresentação do estímulo condicionado, CS- ($P = 0,0003$), indicando que a taxa de congelamento se manteve elevada ao longo do tempo, mesmo após o término da apresentação do tom.

FIGURA 21 - Taxa de congelamento do grupo pareado ao longo da sessão de teste realizado no contexto A (memória ao tom), 7 dias após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente entre grupos. A letra “a” indica a diferença intra grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS-)

A **FIGURA 22** sintetiza os resultados experimentais referentes ao teste do grupo não-pareado realizado 7 dias após o condicionamento no contexto A. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas evidenciou existirem diferenças significativas quanto aos fatores (1) tempo ($F_{(2, 88)} = 7,672$, $P=0,0008$) e (2) tratamento ($F_{(1, 88)} = 6,597$, $P=0,0119$), mas sem interação entre os fatores ($F_{(2, 88)} = 0,1839$, $P=0,8323$).

FIGURA 22 - Taxa de congelamento do grupo não-pareado ao longo da sessão de teste realizado no contexto A (memória ao tom), 7 dias após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente entre grupos.

Em relação ao teste 7 dias após o condicionamento, não houve diferença entre os grupos pareados salina x cortico ($t_{(30)} = 0,7981$, $P = 0,4311$) quando foram testados no contexto B (**FIGURA 23**), logo a corticosterona não influenciou o comportamento dos animais. O mesmo ocorreu para o grupo não-pareado, pois o teste t para amostras independentes demonstrou não haver diferença entre os grupos salina x cortico ($t_{(28)} = 0,4736$, $P = 0,6395$) (**FIGURA 24**).

FIGURA 23 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A 7 dias após o condicionamento aversivo).

FIGURA 24 - Taxa de congelamento do grupo não-pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (7 dias após o condicionamento aversivo).

Os resultados abaixo descritos, dizem respeito ao primeiro experimento do mestrado propriamente dito, no qual também foi utilizada a corticosterona.

A **FIGURA 25** sintetiza os resultados experimentais referentes ao grupo pareado quando o teste foi realizado após o treino no contexto A. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas evidenciou existirem diferenças significativas quanto ao fator tempo ($F_{(2, 66)} = 31,39$, $P < 0,0001$), mas não em relação ao fator tratamento ($F_{(1, 66)} = 0,03112$, $P = 0,8605$) e interação entre os fatores ($F_{(2, 66)} = 0,206$, $P = 0,8144$). O teste complementar de Tukey evidenciou que existem diferenças significativas entre (1) a linha de base do grupo salina quando comparado ao momento onde foi apresentado o estímulo condicionado CS+ ($P = 0,0002$). O mesmo aconteceu com o grupo que recebeu corticosterona, (2) a apresentação do CS+ aumentou a taxa de congelamento quando comparado à linha de base ($P < 0,0001$); esse comportamento já era esperado, uma vez que os animais do grupo pareado tem uma forte associação do tom com a apresentação do choque. Além disso, a taxa de congelamento se manteve elevada ao longo do tempo, mesmo após o término da apresentação do tom, independentemente do tratamento: (3) a linha de base do grupo salina vs. CS- ($P = 0,001$) e (4) linha de base do grupo cortico vs. CS-: cortico ($P = < 0,0001$).

FIGURA 25 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante teste realizado no contexto A (memória ao tom), 24h após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença

existente entre grupos. A letra “a” indica a diferença intra-grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS-)

Na **FIGURA 26** temos a síntese dos resultados experimentais referentes ao grupo não-pareado no teste realizado 24h após o condicionamento no contexto A. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas evidenciou que existem diferenças significativas quanto ao fator (1) tempo (fator tempo $F_{(2, 66)} = 46,45$, $P < 0,0001$), mas não em relação aos fatores tratamento ($F_{(1,66)} = 2,936$, $P = 0,0913$) e interação entre os fatores ($F_{(2, 66)} = 0,3343$, $P = 0,7171$). O teste complementar de Tukey evidenciou existirem diferenças significativas entre: (1) a linha de base do grupo salina vs. CS+ ($P < 0,0001$), (2) linha de base do grupo cortico vs. CS+ ($P < 0,0001$), indicando que a taxa de congelamento aumentou após a apresentação do tom, independentemente do grupo experimental. Dessa forma, os animais do grupo não-pareado também relacionaram o tom a apresentação do choque, o que não era esperado, visto que eles deveriam ter uma memória contextual mais evidente do que a memória não contextual. A taxa de congelamento também se manteve elevada quando (3) a linha de base do grupo salina foi comparada com o CS- ($P < 0,0001$), e o mesmo aconteceu para o grupo corticosterona (4) linha de base vs. CS- ($P < 0,0001$). Isso indica que os animais continuaram a demonstrar medo quando foi cessada a apresentação do tom, independentemente do grupo experimental.

FIGURA 26 - Taxa de congelamento do grupo não-pareado durante teste realizado no contexto A (memória ao tom), 24h após o condicionamento

aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente entre grupos. As letras “a” e “b” indicam a diferença intra-grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS- tanto para “a”, quanto para “b”).

Já para o treino no contexto B, 24h após o condicionamento para o grupo pareado (FIGURA 27), o teste *t* independente demonstrou que não houve diferença entre os grupos salina x cortico ($t_{(22)} = 0,1092$, $P = 0,9141$), demonstrando que a cortico não provocou efeitos na consolidação da memória dos animais, o mesmo ocorreu para o grupo não-pareado (FIGURA 28), onde o teste *t* independente demonstrou que não houve diferença entre o grupo salina pareado x cortico não- pareado ($t_{(22)} = 0,6592$, $P = 0,5166$).

FIGURA 27 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (26h após o condicionamento aversivo).

FIGURA 28 - Taxa de congelamento do grupo não-pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (26h após o condicionamento aversivo).

Em relação ao teste do grupo pareado realizado 7 dias após o condicionamento no contexto A, (**FIGURA 29**) a ANOVA de duas vias com medidas repetidas, evidenciou existirem diferenças significativas quanto aos fatores: (1) tempo ($F_{(2, 66)} = 9,833$, $P=0,0002$), e (2) tratamento ($F_{(1, 66)} = 21,27$ $P<0,0001$), mas não interação entre os fatores ($F_{(2, 66)} = 2,218$; $P=0,1169$). O teste complementar a ANOVA evidenciou diferença significativa entre (1) a linha de base salina vs. CS+ ($P = 0,0006$) e (2) linha de base vs CS- ($P = 0,0154$). Tais resultados indicam que a taxa de congelamento aumentou após a apresentação do tom, mostrando que os animais relacionaram o tom a apresentação do choque. A taxa de congelamento se manteve elevada após a apresentação do tom, ou seja, os animais continuaram a demonstrar um comportamento de medo.

A **FIGURA 30** sintetiza os resultados experimentais referentes ao teste do grupo não-pareado realizado 7 dias após o condicionamento no contexto A. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas evidenciou que existem diferenças significativas quanto ao fator (1) tempo (fator tempo $F_{(2, 66)} = 25,23$, $P < 0,0001$), mas não em relação ao fator tratamento ($F_{(1, 88)} = 6,597$, $P=0,0119$) e interação entre os fatores ($F_{(2, 88)} = 0,1839$, $P=0,8323$). O teste complementar de Tukey evidenciou que existem diferenças significativas entre (1) linha de base do grupo salina vs. CS+ ($P = 0,0001$), indicando que a taxa de congelamento aumentou após a apresentação do tom, o que não era esperado, pois os animais não-pareados não deveriam relacionar tom com choque, ou seja eles não deveriam congelar após a apresentação do tom, (2) linha de base do grupo salina vs. ausência do estímulo condicionado (CS-): salina ($P = 0,0003$), indicando que a taxa de congelamento aumentou após a apresentação do tom, (3) linha de base vs. CS+ ($P = 0,0013$), (4) linha de base do grupo vs. CS- ($P = 0,0031$), indicando que a taxa de congelamento se manteve elevada após o término do tom, independentemente do grupo experimental.

FIGURA 29 – Taxa de congelamento do grupo pareado ao longo da sessão de teste realizado no contexto A (memória ao tom), 7 dias após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente entre grupos. As letras “a” e “b” indicam a diferença intra-grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS- tanto para “a”, quanto para “b”).

FIGURA 30 - Taxa de congelamento do grupo não-pareado ao longo da sessão de teste realizado no contexto A (memória ao tom), 7 dias após o

condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente entre grupos. As letras “a” e “b” indicam a diferença intra-grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS- tanto para “a”, quanto para “b”).

Para o teste 24h no contexto B, o teste *t* independente demonstrou que para ambos os grupos (**FIGURA 31** - grupo pareado, **FIGURA 32**- grupo não-pareado) não houve diferença significativa quando os animais (independente do tratamento) foram testados nesse contexto (salina pareado x cortico pareado ($t_{(22)} = 0,1092$, $P = 0,9141$, salina não-pareado x cortico não-pareado, $t_{(22)} = 0,6592$, $P = 0,5166$), indicando que a corticosterona não influenciou na consolidação de memória dos animais. No teste 7 dias, o resultado foi semelhante ao teste de 24h, a corticosterona não modulou o processo de consolidação da memória dos animais (**FIGURA 33** - grupo pareado, **FIGURA 34** - grupo não-pareado), visto que o teste *t* independente não indicou diferenças entre os grupos (salina não pareado x cortico não-pareado, $t_{(22)} = 0,1875$, $P = 0,853$, salina não pareado x grupo cortico não- pareado, $t_{(22)} = 1,057$, $P = 0,3018$).

FIGURA 31 – Taxa de congelamento do grupo pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (24h após o condicionamento aversivo).

FIGURA 32 - Taxa de congelamento do grupo não-pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (24h após o condicionamento aversivo).

FIGURA 33 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (7 dias após o condicionamento aversivo).

FIGURA 34 - Taxa de congelamento do grupo não-pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (7 dias após o condicionamento aversivo).

Resultados do segundo experimento realizado no mestrado, com dexametasona.

A **FIGURA 35** sintetiza os resultados do grupo pareado referentes ao teste realizado 24h após o condicionamento no contexto A. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas evidenciou que existem diferenças significativas quanto aos fatores (1) tempo ($F_{(2,66)} = 63,2$, $P < 0,0001$) e (2) interação ($F_{(2,66)} = 3,785$, $P = 0,0278$), mas não para o fator tratamento ($F_{(1,66)} = 0,01966$, $P = 0,8889$). O teste complementar de Tukey evidenciou que existem diferenças significativas entre (1) linha de base do grupo salina vs. CS+ ($P < 0,0001$), (2) linha de base do grupo DEXA vs. CS+ ($P < 0,0001$), demonstrando haver um aumento na taxa de congelamento após a apresentação do tom, indicando que os animais desse do grupo pareado fizeram a associação do tom ao choque (salina/dexa), o que já era esperado, (3) linha de base do grupo salina vs. CS- ($P < 0,0001$), (4) linha de base do grupo DEXA vs. CS- ($P = 0,0006$), indicando que a taxa de congelamento se manteve elevada após a apresentação do tom com ambos os tratamentos.

FIGURA 35 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante teste realizado no contexto A (memória ao tom), 24h após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente entre grupos. As letras “a” e “b” indicam a diferença intra-grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS- tanto para “a”, quanto para “b”).

No que diz respeito ao grupo não-pareado no mesmo contexto A (**FIGURA 36**), o teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas, evidenciou que existem diferenças significativas quanto aos fatores (1) tempo ($F_{(2,66)} = 12,29$, $P < 0,0001$), (2) tratamento ($F_{(1,66)} = 11,34$, $P = 0,0013$), mas não em relação ao fator interação ($F_{(2,66)} = 2,222$, $P = 0,1164$). O teste complementar de Tukey evidenciou que existe diferença significativa entre (1) linha de base do grupo salina vs. linha de base do grupo DEXA ($P = 0,0328$), indicando que a dexta aumentou a taxa de congelamento antes da apresentação do estímulo condicionado, (2) linha de base do grupo salina vs. CS+ ($P = 0,004$), (3) linha de base do grupo salina vs. CS- ($P < 0,0001$), (4) linha de base do grupo DEXA vs. CS- ($P = 0,0006$), mostrando que a taxa de congelamento se manteve elevada após o término do tom, independentemente do grupo experimental.

FIGURA 36 – Taxa de congelamento do grupo não-pareado durante teste realizado no contexto A (memória aversiva não-contextual), 24h após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente entre grupos. A letras “a” indica a diferença intra-grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS-).

No teste de 7 dias (**FIGURA 37**), para o grupo pareado, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas, evidenciou que existem diferenças significativas quanto ao fator (1) tempo ($F_{(2,66)} = 5,864$, $P = 0,0045$) e (2) interação ($F_{(2,66)} = 3,785$, $P = 0,0278$), mas não em relação ao fator tratamento ($F_{(1, 66)} = 1,509$; $P = 0,2237$). O teste complementar de Tukey evidenciou que existe diferença significativa entre (1) linha de base do grupo salina vs. CS+ ($P < 0,0001$), (2) linha de base do grupo DEXA vs. CS+: ($P = 0,0002$), indicando que a taxa de congelamento aumentou após a apresentação do tom, independentemente do tratamento que o grupo recebeu, (3) linha de base do grupo salina vs. CS- ($P < 0,0001$), (4) linha de base do grupo DEXA vs. CS- ($P = 0,6808$), indicando que a taxa de congelamento se manteve elevada ao término da apresentação do tom, independentemente do tratamento farmacológico pelo qual os animais foram submetidos.

FIGURA 37 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante teste realizado no contexto A (memória aversiva não-contextual), 7 dias após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente entre grupos. As letras “a” e “b” indicam a diferença intra grupo (baseline é diferente de CS+ e de CS- tanto para “a”, quanto para “b”), e a letra “c”, indica que CS+ é diferente de CS-.

Para o grupo não-pareado (**FIGURA 38**), o teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas, evidenciou que existem diferenças significativas quanto aos fatores (1) tempo ($F_{(2,66)} = 12,29$, $P < 0,0001$), (2) tratamento ($F_{(1,66)} = 2,48$, $P = 0,1201$), mas não em relação ao fator interação ($F_{(2, 66)} = 1,076$; $P = 0,3468$). O teste complementar a ANOVA evidenciou que existem diferenças significativas entre (1) linha de base do grupo salina vs. linha de base do grupo DEXA ($P = 0,0328$), indicando que a taxa de congelamento aumentou antes da apresentação do tom, (2) linha de base do grupo salina vs. CS- ($P = 0,0004$), indicando que a taxa de congelamento aumentou ao longo do tempo, nesse grupo.

FIGURA 38 - Taxa de congelamento do grupo não- pareado durante teste realizado no contexto A (memória ao tom), 7 dias após o condicionamento aversivo. As linhas com asterisco estão sendo utilizadas para descrever a diferença existente intergrupo.

A análise estatística do teste realizado 24h após o condicionamento, no contexto B, tanto para o grupo pareado (**FIGURA 39**) quanto para o não-pareado (**FIGURA 40**), demonstrou que independente do tratamento, não houve diferença entre os grupos (salina pareado x dexta pareado, $t_{(22)} = 0,1092$, $P = 0,9141$, salina não- pareado x dexta não pareado, $t_{(22)} = 0,6592$, $P = 0,5166$), indicando que a dexametasona não influenciou no comportamento dos animais.

FIGURA 39 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (24h após o condicionamento aversivo). A linha com asterisco está sendo utilizada para descrever a diferença existente entre grupos.

FIGURA 40 - Taxa de congelamento do grupo não-pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (24h após o condicionamento aversivo).

Em relação ao teste de 7 dias no contexto B, o resultado foi o mesmo do que o obtido no teste de 24h, o teste t independente demonstrou que não houve diferenças significativas entre os grupos independente do tratamento (salina não x dexta não-pareado ($t_{(22)} = 0,6895$, $P = 0,4977$, **FIGURA 41**, salina não-pareado x dexta não-pareado ($t_{(22)} = 1,527$, $P = 0,1411$, **FIGURA 42**).

FIGURA 41 - Taxa de congelamento do grupo pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (7 dias após o condicionamento aversivo).

FIGURA 42 - Taxa de congelamento do grupo não-pareado durante o teste realizado no contexto B (memória contextual), 2h após o teste no contexto A (7 dias após o condicionamento aversivo).

6. DISCUSSÃO

Situações de estresse agudo são comuns no dia a dia e, geralmente, estão associadas a facilitação de processos de consolidação de memória. Porém, dependendo de sua intensidade, podem desencadear quadros neuropatológicos. O objetivo principal desse estudo foi testar se seria possível mimetizar certos aspectos relacionados ao TEPT em ratos Wistar por meio injeção de glicocorticóides sintéticos após condicionamento aversivo. Resumidamente, os resultados desse trabalho demonstram que os animais do grupo pareado, conseguiram fazer a associação do tom com o choque (**FIGURAS 17,25,35**), apresentando respostas elevadas de congelamento quando testados ao preditor correto (o tom), em um contexto diferente de onde foram condicionados (contexto A). Adicionalmente, o tratamento com corticosterona e dexametasona prejudicou essa associação (**FIGURAS 18,23,37**). Em relação aos animais do grupo não pareado, esperava-se que a manipulação farmacológica com glicocorticóides sintéticos causasse alterações semelhantes às observadas em pacientes com TEPT, sendo elas uma

hipermnésia relacionada ao trauma e uma perda de discriminação dos estímulos que predizem a memória. A hipótese, portanto, era que os animais do grupo não-pareado aumentassem a taxa de congelamento ao preditor errado, o tom, e diminuíssem as taxas de congelamento ao preditor correto, o contexto. Em outras palavras, esses animais apresentariam uma generalização da memória ao tom e um déficit de memória contextual. Os resultados obtidos apontam uma generalização da memória ao preditor incorreto, com maiores respostas de medo ao tom.

No experimento 1, foi observado que os animais do grupo pareado controle condicionaram ao tom, apresentando uma resposta aversiva maior após a apresentação do mesmo (**FIGURA 17**). O teste para o grupo tratado, mostrou que a corticosterona prejudicou a formação da memória ao tom (**FIGURA 17**) no teste 24h após condicionamento, resultado que se manteve no teste depois de 7 dias (**FIGURA 21**). O teste para a memória contextual evidenciou que as taxas de congelamento não estavam muito elevadas (em torno de 40%), não sendo observada diferença estatística entre o grupo controle e tratado em ambos os testes (24h – **FIGURA 19** / 7dias - **FIGURA 23**). Em relação ao grupo não-pareado controle, quando testados para o preditor incorreto (tom, na caixa A), apresentaram taxas de congelamento relativamente baixas (**FIGURA 18**), sugerindo que não associaram o tom ao contexto, como esperado. A corticosterona não foi capaz de provocar uma generalização da resposta aversiva (**FIGURA 18**). Quando testados para o preditor correto, no contexto B (onde foram condicionados), apresentaram taxas de congelamento em torno de 50% (**FIGURA 20**). No grupo tratado, a corticosterona (**FIGURA 20**) não foi capaz de causar um déficit de memória contextual, sugerindo assim, que o condicionamento não foi aversivo o suficiente para que o animal desenvolvesse uma memória traumática. Dessa forma, o protocolo experimental foi modificado, sendo adicionado um ciclo a mais de tom/choque na sessão de condicionamento para tentar aumentar a aversividade do treinamento.

O experimento 2 mostrou que os animais do grupo pareado controle condicionaram ao tom (**FIGURA 25**), sendo observada uma resposta aversiva maior durante e após a apresentação do mesmo. Tal resposta se

manteve no teste de 7 dias (**FIGURA 29**). Os dados do grupo tratado indicam que a corticosterona prejudicou a formação da memória ao tom (**FIGURA 25**), para o teste de 24h após o condicionamento, mas não para o teste de 7 dias (**FIGURA 29**). Para o grupo não- pareado controle (**FIGURA 26**), o teste ao preditor incorreto (tom) evidenciou que os animais associaram o contexto ao tom. Como as taxas de congelamento do grupo controle estavam com valores no teto (em torno de 100%), não foi possível observar possíveis efeitos generalizadores da corticosterona (**FIGURA 26**). Esse mesmo grupo, quando testado para memória contextual (preditor correto), demonstrou taxas mais elevadas de congelamento do que no experimento anterior (~40% vs ~60%), contudo, a corticosterona não causou déficits (**FIGURA 28**). A associação tom-choque no grupo não-pareado provavelmente foi um problema decorrente do aumento de ciclos tom-choque durante o condicionamento. Para tentar evitar a associação entre esses estímulos no grupo não-pareado, no experimento 3 o tom e o choque foram apresentados em dias distintos.

No experimento 3, foi observado que os animais do grupo pareado controle condicionaram ao tom, apresentando uma resposta aversiva maior durante e após a apresentação desse estímulo (**FIGURA 35**). No grupo tratado, a dexametasona não alterou as taxas de congelamento no teste 24h (o que tinha acontecido nos experimentos anteriores); no entanto, no teste de 7 dias foi observada uma diminuição no tempo congelamento após a apresentação do tom (CS-), que é condizente com os experimentos anteriores (**FIGURA 37**). No que diz respeito a memória contextual, quando os animais foram testados no contexto B, sem o preditor correto, o grupo tratado demonstrou taxas de congelamento mais elevadas quando comparadas as taxas do grupo controle (**FIGURA 39**), sugerindo uma maior associação contextual no grupo tratado. Essa diferença não se manteve após 7 dias (**FIGURA 41**). Com as modificações no protocolo experimental, os animais do grupo controle não-pareado, não associaram os estímulos (tom e choque) apresentados em dias diferentes, como era esperado. De forma interessante, a dexametasona promoveu um aumento das taxas de congelamento antes mesmo da apresentação do tom, no período basal, sugerindo que os animais sofreram uma generalização da memória (**FIGURA 37**). Essa diferença foi

mantida no teste de 7 dias (**FIGURA 41**). Também foi observado um aumento da taxa de congelamento durante a apresentação do tom. O preditor correto (contexto) não foi capaz de evocar uma memória muito forte, visto que as taxas de congelamento ficaram em torno de 30% no grupo controle; além disso, não foi observado um prejuízo da memória do tratamento com dexametasona, possivelmente porque as taxas de congelamento do grupo controle já estavam com valores baixos. Em suma, os animais do grupo não-pareado tratados com dexametasona demonstraram generalização da memória associativa ao tom; porém, não foi possível verificar o déficit de memória contextual.

Glicocorticoides desempenham um papel modulatório importante sobre a memória e a cognição e que seus efeitos são dose-dependente (Joëls 2006, Wang, 2014, Marks 2015). Por exemplo, foi demonstrado que a administração de corticosterona após a exposição a um estressor pode levar a prejuízos na consolidação da memória (An, et al, 2013, Khaksari et al, 2007 Marloes et al, 2009, Wang et al, 2014). Kauone e colaboradores (2012) mostraram que tal prejuízo de memória contextual pode vir acompanhado, dependendo da intensidade do estímulo aversivo, de generalização do medo. Em relação as doses de corticosterona, utilizadas, existe uma grande variação, indo de 40 mg/Kg (Marks e colaboradores 2015) a 0,3mg/kg (Bueno e colaboradores 2017). Nosso estudo reforçou que, mesmo utilizando uma dose relativamente baixa (2,5mg/kg), é possível afetar processos de formação de memórias aversivas.

Khaksari et al, 2007, tinham como objetivo, investigar o papel da síntese proteica (no encéfalo) e dos receptores de corticosterona na indução de prejuízos na evocação da memória. Os animais foram submetidos a um teste de retenção de memória no labirinto aquático, e receberam corticosterona após o teste. Seus resultados mostraram que os glicocorticoides prejudicam a recuperação da memória através de mecanismos não-genômicos envolvendo uma interação com MRs centrais (Khaksari et al, 2007). No nosso trabalho, o prejuízo causado pela corticosterona foi relacionado a memória ao tom.

Por outro lado, Wang et al, 2014, realizaram um estudo com ratos a fim de verificar um possível efeito ansiolítico da corticosterona. Utilizaram

como modelo experimental o medo condicionado, e analisaram o efeito imediato (1 h) e tardio (24 h) da administração desse glicocorticoide (25 mg / kg, i.p). Seus resultados mostraram que, mesmo utilizando uma dose alta, a manipulação farmacológica não promoveu alterações na expressão do medo induzido pelo tom, e nem no medo contextual, para os efeitos imediatos e tardios quando comparados com o grupo controle.

An et al. (2013) realizaram um estudo com o objetivo de investigar se a consolidação da memória aversiva em ratos (com a capacidade de resposta ao estresse, alta e baixa, respectivamente) poderia ser prejudicada pela administração de altas doses de corticosterona (25 mg/kg) pós-treinamento. Os animais foram submetidos ao condicionamento pelo medo e separados em grupos, de acordo com a resposta de congelamento durante o condicionamento. Os autores demonstraram que os animais com alta capacidade de resposta ao estresse tiveram prejuízos na consolidação da memória. Em nosso trabalho, obtivemos uma resposta bastante variável entre animais do mesmo grupo, apesar de estarmos trabalhando com uma população homogênea. Talvez uma alternativa interessante seria analisar os dados subdividindo em animais que tiveram uma alta ou baixa resposta ao estresse. Quando olhamos para situações reais, também há uma resposta comportamental variável de pessoa para pessoa frente a situações da vida real, que podem desencadear um trauma.

Adicionalmente, Dagnino-Subiabre e colaboradores, em 2012, realizaram um estudo com o objetivo de determinar os efeitos da administração crônica de corticosterona no condicionamento aversivo auditivo e visual. Utilizaram 400mg de corticosterona dissolvida em água e forneceram aos animais para ingestão oral. Seus resultados indicaram que a corticosterona diminuiu as respostas condicionadas auditivas em comparação ao grupo controle. Apesar do modo de administração da droga não ter sido o mesmo, visto que em nosso trabalho a via utilizada foi intraperitoneal, os resultados obtidos pelos pesquisadores estão de acordo com os nossos (**FIGURAS 18,23,27**), onde é possível observar que a corticosterona provocou prejuízos na memória ao tom. No experimento 3, foi possível observar também que a

dexametasona provocou uma diminuição na taxa de congelamento para o teste de memória ao tom 7 dias após o condicionamento (**FIGURA 37**).

É importante ressaltar que os glicocorticoides endógenos possuem variações circadianas, tendo seu pico de expressão pela manhã, e vão decaindo durante o dia (Dickmeis, 2008, Ramamoorthy e Cidlowski, 2017). Todos os experimentos descritos nessa dissertação foram realizados no período da manhã, iniciando às 8h. No entanto, no presente trabalho, não foi realizada uma dosagem dos níveis basais de corticoides dos animais antes do início dos experimentos. Dessa forma, não há garantias de que a quantidade de corticoide sintético aplicada tenha sido a ideal para alcançar taxas elevadas e, conseqüentemente, ocasionar os efeitos desejados. Além de atuar sobre a memória e a cognição, os glicocorticoides, podem ter outras funções como, por exemplo, regular o metabolismo processos inflamatórios, homeostase. Na clínica, são utilizados no tratamento de inúmeras patologias inflamatórias e autoimunes. Sabendo isso, não podemos descartar uma possível ação anti-inflamatória deles (Adcock e Mumby, 2017).

A generalização da resposta aversiva é um aspecto importante do comportamento. Como discutido na introdução, a capacidade de generalizar a memória permite adaptação a mudanças ambientais. No entanto, essa capacidade pode ser prejudicial, quando demasiada, podendo levar ao desenvolvimento de respostas não adaptativas como nos transtornos de ansiedade e TEPT. Kaouane e colaboradores (2012) fornecem evidências de que é possível reproduzir, em modelos animais, certas alterações mnemônicas semelhantes a TEPT. Os autores desenvolveram um modelo comportamental a fim de avaliar a capacidade de camundongos de restringir as respostas de medo apenas ao contexto onde receberam um choque pareado com um tom. Especificamente, os autores testaram se a injeção de corticosterona após o condicionamento pelo medo seria capaz de gerar comportamentos semelhantes a TEPT em camundongos. De forma resumida, os autores mostraram que os animais tratados: (1) generalizaram a resposta de medo quando testados em um contexto onde não foram condicionados e (2) apresentaram prejuízo de memória contextual. Como exposto anteriormente, o tratamento agudo com dexametasona promoveu um aumento das taxas de

congelamento nos animais tratados antes mesmo da apresentação do tom, no período basal, sugerindo que os animais apresentaram generalização da memória. Esse efeito foi também observado no teste de 7 dias. Estudos adicionais são necessários para elucidarmos os mecanismos responsáveis por estes efeitos.

Uma limitação do presente estudo é que a administração sistêmica da corticosterona e da dexametasona não garante efeitos em regiões encefálicas específicas. Idealmente, a infusão intra-encefálica em estruturas relacionadas aos processos de formação de memórias aversivas/traumáticas, como o hipocampo, poderia nos trazer resultados mais refinados. Por exemplo, em um dos experimentos reportados por Kaoune e seus colaboradores (2012), foi realizada infusão intrahipocampal de corticosterona e demonstraram que para o grupo pareado a corticosterona não provocou alterações significativas nas respostas aversivas, enquanto que para o grupo não-pareado, quando a administração foi acompanhada de uma intensidade de choque de 0.8mA, problemas de memória semelhantes ao TEPT apareceram, ou seja, os animais não demonstraram medo em resposta ao contexto, como deveriam, mas sim em resposta ao tom.

7. CONCLUSÃO

Nossos achados sugerem 1) a corticosterona é capaz de prejudicar a memória associativa a um estímulo (ao tom) a curto e a longo prazo 2) a dexametasona é capaz de provocar uma generalização da resposta aversiva para animais que deveriam ter uma associação contextual mais forte do que a associação a um estímulo (tom). Esses resultados podem contribuir para o entendimento dos mecanismos responsáveis pela formação de memórias traumáticas e para a compreensão de como a manipulação farmacológica pode auxiliar no tratamento de patologias psicológicas como o TEPT.

8. REFERÊNCIAS

- Adcock, I. M., & Mumby, S. (2016). Glucocorticoids. *Pharmacology and Therapeutics of Asthma and COPD*, 171–196.
- Br. J. Pharmac. (1978), 62, 19-24 CAN SOCIAL BE USED TO INTERACTION MEASURE ANXIETY? SANDRA E. FILE & J.R.G. HYDE Department of Pharmacology, The School of Pharmacy, University of London,
- Cruz, A. P. M., e Landeira-Fernandez, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. Em: J. landeira-Fernandez e Sérgio Fukushima (org), *Métodos em Neurociência*. São Paulo: Manole, 192 – 217, 2012.
- Dagnino-Subiabre, A., Pérez, M. Á., Terreros, G., Cheng, M. Y., House, P., & Sapolsky, R. (2012). Corticosterone treatment impairs auditory fear learning and the dendritic morphology of the rat inferior colliculus. *Hearing Research*, 294(1-2), 104–113
- De Quervain, D., Schwabe, L., & Roozendaal, B. (2016). Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(1), 7–19.
- Dickmeis, T. (2008). Glucocorticoids and the circadian clock. *Journal of Endocrinology*, 200(1), 3–22.
- Flandreau, E. I., & Toth, M. (2017). Animal Models of PTSD: A Critical Review. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. doi:10.1007/7854_2016_65
- Finsterwald, C., & Alberini, C. M. (2014). Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: From adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiology of Learning and Memory*, 112, 17–29. doi:10.1016/j.nlm.2013.09.017
- Graeff, F. G. (2007). Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 29(suppl 1), s3–s6. doi:10.1590/s1516-44462007000500002

Gregory J. Quirk. 2017. Less fear, more diversity. PLOS Biology 15, 4 (2017), e2002079. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002079>

Handley, S. L., & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 327(1), 1–5. doi:10.1007/bf00504983

Joëls, M. (2006). Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. Trends in Pharmacological Sciences, 27(5), 244–250.

Kandel, E.R., *et al.* The molecular and systems biology of memory. Leading Edge Rev, v.157, n.1, Mar p.163-186. 2014.

Kandel, E.R., *et al.* Princípios de neurociências. Editora: MCGRAW-HILL. 2014.

Kaouane N, et al. Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. Science, v.335, n. 6075, p. 1510-1513. 2012.

Khaksari et al .Central mineralcorticoid receptors are indispensable for corticosterone-induced impairment of memory retrieval in rats. Neuroscience, n.149, v.4, Nov,p.729-38.2007.

Kim, E. J., Pellman, B., & Kim, J. J. (2015). Stress effects on the hippocampus: a critical review. Learning & Memory, 22(9), 411–416.

Koenigs, M., Grafman, J. Post-traumatic stress disorder: The role of medial prefrontal cortex and amygdala. Neuroscientist, v.15, n.5, Oct, p.540–548. 2009.

Lent, R. Cem Bilhões de Neurônios. Editora Atheneu. 2002

Mateo, J. M. Inverted-U shape relationship between cortisol and learning in ground squirrels. Neurobiol Learn Mem, v.4, n.89, May, p.582–590. 2008.

Marks, W. N., Fenton, E. Y., Guskjolen, A. J., & Kalynchuk, L. E. (2015). The effect of chronic corticosterone on fear learning and memory depends on dose and the testing protocol. Neuroscience, 289, 324–333.

Meir Drexler, S., & Wolf, O. T. (2017). The role of glucocorticoids in emotional memory reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 142, 126–134. doi:10.1016/j.nlm.2016.11.008

MCEWEN, B. S., WEISS, J. M., & SCHWARTZ, L. S. (1968). Selective Retention of Corticosterone by Limbic Structures in Rat Brain. *Nature*, 220(5170), 911–912.

Monsey MS, Boyle LM, Zhang ML, Nguyen CP, Kronman HG, Ota KT, et al. (2014) Chronic Corticosterone Exposure Persistently Elevates the Expression of Memory-Related Genes in the Lateral Amygdala and Enhances the Consolidation of a Pavlovian Fear Memory. *PLoS ONE* 9(3): e91530.

Monsey, M. S., Boyle, L. M., Zhang, M. L., Nguyen, C. P., Kronman, H. G., Ota, K. T. Schafe, G. E. (2014). Chronic Corticosterone Exposure Persistently Elevates the Expression of Memory-Related Genes in the Lateral Amygdala and Enhances the Consolidation of a Pavlovian Fear Memory. *PLoS ONE*, 9(3), e91530.

Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 3–33. doi:10.1016/s0014-2999(03)01272-x

Quaedflieg, C. W. E. M., & Schwabe, L. (2017). Memory dynamics under stress. *Memory*, 26(3), 364–376. doi:10.1080/09658211.2017.1338299

Tsai, K.-J., Sze, C.-I., Lin, Y.-C., Lin, Y.-J., Hsieh, T.-H., & Lin, C.-H. (2016). A Single Postnatal Dose of Dexamethasone Enhances Memory of Rat Pups Later in Life. *PLOS ONE*, 11(10), e0165752. doi:10.1371/journal.pone.0165752

VILELA, Lúcia Helena Moraes and JURUENA, Mario Francisco. Avaliação do funcionamento do eixo HPA em deprimidos por meio de medidas basais: revisão sistemática da literatura e análise das metodologias utilizadas. *J. bras. psiquiatr.* [online]. 2014, vol.63, n.3, pp.232-241. ISSN 0047-2085.~

Wang, H., Xing, X., Liang, J., Bai, Y., Lui, Z., & Zheng, X. (2014). High-dose corticosterone after fear conditioning selectively suppresses fear renewal by

reducing anxiety-like response. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124, 188–195.

Yehuda, R., Hoge, C. W., McFarlane, A. C., Vermetten, E., Lanius, R. A., Nievergelt, C. M., Hyman, S. E. (2015). Post-traumatic stress disorder. *Nature Reviews Disease Primers*, 15057.

Yokoyama, M., & Matsuo, N. (2016). Loss of Ensemble Segregation in Dentate Gyrus, but not in Somatosensory Cortex, during Contextual Fear Memory Generalization. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10.