

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

A administração repetida de um agonista do receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos gama (PPAR γ) reverte o prejuízo na extinção da memória de medo condicionado ao contexto em animais submetidos a um modelo de transtorno do estresse pós-traumático

Antonio Furtado da Silva Jr

Ribeirão Preto
2023

ANTONIO FURTADO DA SILVA JÚNIOR

A administração repetida de um agonista do receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos gama (PPAR γ) reverte o prejuízo na extinção da memória de medo condicionado ao contexto em animais submetidos a um modelo de transtorno do estresse pós-traumático

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa

Moraes

Ribeirão Preto

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

Silva-Júnior, Antonio Furtado

A administração repetida de um agonista do receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos gama (PPAR γ) reverte o prejuízo na extinção da memória de medo condicionado ao contexto em animais submetidos a um modelo de transtorno do estresse pós-traumático

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Ressel, Leonardo Barbosa Moraes

1. Pioglitazona
2. Medo condicionado ao contexto
3. Receptores PPAR
4. Transtorno do estresse pós-traumático
5. Estresse

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Antonio Furtado da Silva Júnior

Título: A administração repetida de um agonista do receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos gama (PPAR γ) reverte o prejuízo na extinção da memória de medo condicionado ao contexto em animais submetidos a um modelo de transtorno do estresse pós-traumático

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia

Data da Defesa:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes (FMRP/USP Ribeirão Preto)

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Este trabalho é dedicado à minha família sanguínea e não sanguínea. O apoio incondicional, amor, amizade, compaixão e as memórias juntos é o que temos de mais importante, e o que nos impulsiona para alcançarmos lugares mais altos no mundo ideal e material.

*“O que poderia ter sido e o que foi
Convergem para um só fim, que é sempre o
presente. Ecoam passos na memória
Ao longo das galerias que não percorremos
Em direção à porta que jamais abrimos
Para o roseiral. Assim ecoam minhas
palavras em tua lembrança.”*

T.S. Elliot

*“Quando você parte, tudo o que você
leva são suas memórias”*

Lana del Rey

AGRADECIMENTOS

Aos animais que serviram de objeto de estudo para essa dissertação, pois sem a contribuição deles nada disso teria sido possível. Nenhuma palavra poderá expressar o quanto a natureza em sua eterna e atemporal sabedoria merece o nosso profundo respeito, agradecimento e admiração como seres vivos deste planeta.

Aos meus pais, Antonio Furtado e Helen Cristina, por todos os ensinamentos que me deram ao longo da vida. Seus ensinamentos serviram como setas de direcionamento em inúmeras situações, dentre os erros e os acertos pude compreender melhor a natureza humana e tomar as rédeas da minha própria vida. Gostaria de agradecer em especial a minha mãe por suportar todas as dores e pesos do mundo em prol de uma criação digna para todos seus filhos e pessoas amadas, e agradecer principalmente os seus esforços de garantir que não nos faltasse comida na mesa, roupa para vestir e estudos para sermos alguém na vida e “não termos que depender de ninguém”

À minha irmã, Kellen Cristina, a mais velha e ‘cabeça-dura’, mas a mais amável e solícita de todos, sempre disposta a ajudar mesmo que tenha que mover céus e terras para isso. Também aos meus irmãos, João Felipe e Mathias Vinícius, pela sua inocência infantil e também pelos seus processos de crescimento e amadurecimento que muito me ensina sobre como as percepções do mundo são vastas. Mesmo com todas as dificuldades que encontramos ao longo de nossas vidas conjuntas, por ocasião do destino e da biologia, sempre buscamos manter o termo “família” como algo a que púdessemos nos agarrar em tempos de tempestade, mas não somente.

Ao meu orientador Dr. Leonardo Resstel por acreditar em mim enquanto seu aluno, por aceitar minha entrada no Laboratório de Neurofarmacologia apenas confiando na minha capacidade e por acreditar nas minhas ideias mais mirabolantes e sempre me apoiar e suportar

com seu olhar crítico e humanístico. Seu carinho para com seus alunos é um exemplo para mim e, logo quando entrei no laboratório, jamais esperei encontrar um orientador tão carinhoso e cuidadoso com todos ao seu redor, além de ser um cientista com um olhar amplo e aberto de como fazer ciência e que me ensina todos os dias a como ser um também.

À minha co-orientadora Andreza Buzolin pelas conversas cotidianas, pelo apoio moral, por dar margem à imaginação de um jovem cientista e pelo apoio com qualquer coisa que eu precisasse referente à vida ou ao projeto mesmo estando milhas de distância. A sua forma de fazer ciência e seu carinho com todos ao redor muito me ensina, obrigado por me acolher e me abraçar em um período da minha vida onde eu estava muito perdido com tudo.

Gostaria de agradecer também às minhas companheiras de lamúrias, lamentações, mas também das alegrias, da vida ‘fitness’, da minha carreira, estrada e jornada acadêmica, Gabriela, Marina e nossa querida técnica Laura. Vocês contribuíram imensamente para a realização deste trabalho, seja como apoio emocional ou com as discussões sobre o andamento do trabalho e até mesmo ajudando com os experimentos. Sinceramente, eu não sei o que seria de mim ao longo desse tempo sem vocês na minha vida. Só consigo dizer obrigado com todo o meu coração, vocês são essenciais na minha vida e saibam que podem contar comigo sempre.

Aos amigos do laboratório do professor Morgan, Ivaldo, do laboratório do Prof. Francisco Guimarães e do Prof. Hélio Zangrossi pelas conversas, acolhimento e discussões sobre a vida de pós-graduandos. Com uma disposição para ajudar incomparável, vocês foram os responsáveis por tornar essa caminhada menos confusa e mais próspera, gratidão a cada um de vocês por tudo ao longo desse tempo, principalmente pela amizade.

Aos queridíssimos e iluminados seres humanos que tive o prazer de conviver e de até hoje chamar de amigos do coração, Jordan, Suélen, Letícia e Adrieli. Vocês são meus exemplos, meus primeiros amigos científicos e minha inspiração também. Agradeço a todo o acolhimento que me proporcionaram quando cheguei em Ribeirão, pelas conversas, apoio emocional, dicas

pra vida e pra carreira... Enfim, uma série de coisas que vocês sabem muito bem e que contribuíram e contribuem para a minha vida. Obrigado por existirem!

Aos melhores amigos que eu poderia ter encontrado na vida, Rebeca, Maria Fiamma, Eloysa, Carol, Leidyane, Alex, Joane e Audreyne que, destituíram-se do título de ‘amigos’ para vestir a camisa de segunda família, mesmo com a distância e com as nossas vidas tomando rumos inesperados, sempre estamos ali, um pelo outro, ajudando no que for preciso e comprando briga com quem quer que seja, incluindo com nós mesmos, no intuito de nos ver sempre bem e razoáveis conosco e com as situações da vida. Não sei o que teria sido de mim se não tivesse encontrado vocês, obrigado por existirem e desfrutarem desse ciclo biológico comigo nesse período da história humana. Vocês são os melhores presentes que a Biologia/UFAM poderia me dar.

Às minhas melhores amigas da época do ensino médio, Zilma Cabral e Bárbara Rebouças. Sinto-me profundamente realizado ao lembrar que nossos pais costumavam falar que amizades do ensino médio não duravam pra vida toda, mas nós prometemos (e estamos cumprindo) que a nossa duraria. Apesar dos inúmeros percalços, situações memoráveis, distanciamentos e (re)aproximações nunca perdemos nossa essência de amigos, e principalmente o contato, estando sempre ali um pelo outro e torcendo para que cada um alcance o máximo dos seus sonhos. O apoio de vocês sempre me moveu para mais longe, obrigado por acreditarem em mim.

Ao meu grupo de amigos da Farmácia/UFAM que me apoiaram incondicionalmente no momento em que decidi largar o curso e vir morar em Ribeirão Preto. Obrigado por serem tão apoiadores e por ajudar com a realização do meu sonho/carreira.

Aos meus grandes amigos e moradores da república Lepidolupe por acolherem um cara de outro estado sem nem conhecer e por compartilharem dos bons drinks às incessantes risadas

no dia-a-dia, a vocês meu mais sincero obrigado, principalmente por serem minha primeira família em Ribeirão Preto.

Ao meu terceiro núcleo familiar composto pelo Matheus (grilo), Léo (euro)), Kally (adc), Péricles (mulherão), Deíne, Daniel, Caio (Cain perereca), Iara (akena), Bianka (Paranauê), Raphael (gelado), Filipe (Inu), Ana júlia (anaju), Ana Clara (Vascão), Ivis, Leevan e Raphael (pka), não tenho palavras para expressar minha gratidão por tudo que fizeram e fazem por mim nesse momento em que me encontro. Sem vocês as noites, os rolês, os jogos e a vida não seriam os mesmos, quero levar vocês também para a vida e após.

A todos do time de vôlei Liga Unificada da Saúde (LUS) por serem o primeiro time a me acolher, graças a vocês pude voltar a jogar o esporte que tanto amo, mas dessa vez aqui em Ribeirão, cada momento e treino com vocês é sempre muito especial e motivador. Além disso, pude ter a chance de conhecer pessoas sensacionais que carrego no coração e quero levar pra vida. LUS!

A todos que jogam no patotas pelas noites mais alegres, rolês e vôlei até cansar a alma e o corpo, com a presença de vocês e do nosso horário agendado pude esquecer dos problemas, conhecer vocês melhor e abrir a porta para que grandes pessoas entrassem na minha vida, gratidão eterna.

Aos meninos da Liga da Atléticas da Universidade da USP Ribeirão Preto (LAURP), representar a faculdade pelo esporte que amo em comunhão com vocês tem sido uma engrenagem motivadora na minha vida e a alegria e amor de vocês pelo esporte ilumina minha vida.

À todos os professores do departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) por contribuírem massivamente para a minha formação profissional.

Aos funcionários do departamento que auxiliam no funcionamento como um todo do prédio, em especial aos que carinhosamente chamo de ‘tios’ e ‘tias’ da limpeza, cuja atuação é essencial para o nosso desenvolvimento pessoal e profissional

Aos funcionários do biotério, em especial ao Orlando, por estarem sempre atentos aos pedidos de animais e suas necessidades, além de realizarem todo o tipo de trabalho necessário à manutenção do biotério. Sem vocês não existiríamos como profissionais, obrigado.

À Gislaine e ao Valdik, membros da secretaria do departamento e os responsáveis por sanar toda e qualquer dúvida burocrática que venhamos a ter, por todo o suporte e atenção dado ao longo desse tempo. O trabalho de vocês é valoroso e digno de reconhecimento, obrigado por estarem sempre dispostos a ajudar.

Agradeço também à banca que aceitou participar da avaliação do presente trabalho e contribuir para a formação pessoal e profissional deste que vos fala.

Por fim, agradeço a toda e qualquer pessoa que seja amigo ou colega e que tenha passado pelo curso da minha efêmera vida e, por ventura, não veio a ser citado neste pequeno texto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Também agradeço ao apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil pelo fornecimento da bolsa de pesquisa que auxiliou na manutenção da minha estadia em Ribeirão Preto para exercer minhas atividades científicas.

RESUMO

SILVA-JÚNIOR, Antonio Furtado. **A administração repetida de um agonista do receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos gama (PPAR γ) reverte o prejuízo na extinção da memória de medo condicionado ao contexto em animais submetidos a um modelo de transtorno do estresse pós-traumático.** 2023. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O Transtorno do Estresse Pós-traumático (TEPT) é considerado um transtorno psiquiátrico que, por meio de um conjunto de sintomas característicos, pode chegar a ser debilitante. Os sintomas envolvem medo associado a ambientes ou pessoas, reexperiência do trauma, hiperexcitação e sintomas negativos de humor. Na patologia estão presentes alterações em estruturas-chaves relacionadas à formação da memória de medo condicionado ao contexto como a amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal medial (CPFm), além de alterações no eixo HPA, neuroendócrinas, neuroimunes e em neurotransmissores. Atualmente, a terapia medicamentosa envolve drogas da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRR), porém não são tão efetivos devido a respostas individualizadas. Dessa forma, a descoberta de novos mecanismos fisiopatológicos pode auxiliar no emprego de outros fármacos para o tratamento. Dentre os quais, pode-se citar os fibratos e as tiazolidinedionas (TZD), utilizadas no tratamento de hipertrigliceridemia e do diabetes tipo 2, respectivamente. Das classes de fármacos citadas, o Fenofibrato, agonista de receptor PPAR α , e a Pioglitazona (TZD), agonista receptor PPAR- γ , possuem importante papel na regulação da expressão gênica de proteínas associadas com neuroproteção e que estão de alguma forma relacionadas com processos de formação de memória. Mesmo com estudos empregando a modulação dos receptores PPAR em modelos de transtornos neuropsiquiátricos sendo escassos, vários trabalhos reportam efeitos benéficos ocasionados pela ativação desses receptores em modelos de transtornos neurodegenerativos e em certo grau na regulação do estresse e de processos cognitivos. Sendo assim, o presente trabalho verificou o papel da administração intraperitoneal sub-crônica de um agonista PPAR γ (Pioglitazona) e PPAR α (Fenofibrato) na modulação da resposta de medo condicionado em animais que foram submetidos ao modelo de estresse-reestresse (SRS) que causa um prejuízo na extinção da memória de medo condicionado ao contexto, característica importante na fisiopatologia do TEPT. Primeiramente foi realizada a padronização do modelo consistindo na verificação do impacto do condicionamento aversivo com choques nas patas em diferentes intensidades (0,65 mA e 0,45 mA), e os resultados apontaram para uma resposta mais homogênea na intensidade de 0,65mA que foi utilizada

durante todos os experimentos. Em seguida, foi verificado se o isolamento dos animais poderia interferir no perfil da resposta do medo condicionado ao contexto (MCC). Dessa forma, os animais que permaneceram isolados ou agrupados em suas moradias tiveram resposta de freezing igualmente menor quando comparado com os animais estressados. Com isso, iniciou-se os testes com a administração intraperitoneal sub-crônica de um agonista dos receptores PPAR γ (Pioglitazona) nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg em animais submetidos ao modelo de SRS que apresentaram prejuízo na extinção da memória de medo associado ao contexto. A dose de 10 mg/kg foi capaz de reverter esse prejuízo. Em seguida, foi testado o agonista de receptores PPAR α (Fenofibrato) nas mesmas doses e não houve nenhum efeito comportamental benéfico aos animais estressados. O uso de antagonistas dos mesmos receptores (GW9662 e GW6457) na dose de 2 mg/kg não apresentaram efeito, confirmando que a ativação dos receptores é necessária para o efeito observado. Por fim, a administração de uma única dose poderia ser o suficiente no efeito benéfico, para isso, foi feita a administração da dose de 10 mg/kg de Pioglitazona em dois momentos: 24h após a extinção e 30 min. antes do dia do teste. Os resultados obtidos mostram que nenhuma das duas doses foi capaz de reverter os efeitos do estresse sobre a extinção memória aversiva. Dessa forma, os resultados acabam por demonstrar experimentalmente que a administração de Pioglitazona, fármaco agonista do receptor PPAR γ , ao longo de 7 dias na dose de 10 mg/kg é capaz de reverter o efeito deletério do estresse, representado pela diminuição no percentual de freezing do animal a níveis semelhantes aos animais que não passaram por nenhum evento estressor

Palavras-chave: transtorno do estresse pós-traumático, receptores PPAR, medo condicionado ao contexto, Estresse, PPAR γ

ABSTRACT

SILVA-JÚNIOR, Antonio Furtado. **Repeated administration of gama peroxisome proliferator-activated receptor agonist (PPAR γ) revert the impairment of fear conditioning memory extinction in rats subjected to a post-traumatic stress disorder model.** 2023. Master Thesis (Msc.). Ribeirao Preto Medical School of the University of São Paulo, Ribeirão Preto. 2023.

Post Traumatic Stress Disorder is a psychiatric disorder that can incapacitate individuals through an assemblage of symptoms. The main set of symptoms involve intense fear associated with places or people, reexperience of the trauma, arousal and negative symptoms associated with humor. The pathology is characterized by morphofunctional changes in key structures of the forebrain that are related with contextual fear memory like, amygdala complex, medial prefrontal cortex and hippocampus, moreover changes in HPA, neuroendocrine, neuroimmune and within neurotransmitters are also present. Nowadays, PTSD therapy involves psychotherapy associated with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) drugs class, nevertheless its effectiveness is limited since individual responses are observed. Therefore, new pharmacological treatments can be available by discovering physiopathologic mechanisms of neuropsychiatric diseases. In this context, Fibrates and Thiazolidinediones actually are only approved to use in hyperlipidemia and type 2 diabetes respectively. From these Pharmacological classes, Fenofibrate, PPAR α agonist, and Pioglitazone, PPAR- γ agonists, are widely described to have an important role on gene expression regulation of neuroprotection associated proteins that are related with memory processes. Even with many studies that employ the modulation of PPAR receptors in neuropsychiatric disorders models are scarce, several studies report beneficial effects resulting from the activation of these receptors in neurodegenerative disorder models and to some extent in the regulation of stress and cognitive processes. Therefore, the present study aimed to investigate the role of repeated intraperitoneal administration of a PPAR γ agonist (Pioglitazone) and a PPAR α agonist (Fenofibrate) in modulating the conditioned fear response in animals subjected to the stress-restress model (SRS), which impairs the extinction of contextual fear memory, an important characteristic in the pathophysiology of PTSD. To begin with it the standardization of the model was performed by assessing the impact of aversive conditioning with different intensities of foot shocks (0.65 mA and 0.45 mA), and the results indicated homogeneous behavior response at the intensity of 0.65 mA, which was used throughout all the experiments. Next, it was verified whether the isolation of animals could interfere with the profile of the contextual fear conditioning response

(CFC). Thus, animals that remained isolated or grouped in their homecage showed equally lower freezing response compared to stressed animals. With this, the tests began with repeated intraperitoneal administration of a PPAR γ receptor agonist (Pioglitazone) at doses of 0.1, 1, and 10 mg/kg in animals subjected to the SRS model, which exhibited impaired extinction of fear memory associated with the context. The dose of 10 mg/kg was able to reverse this impairment. Subsequently, it was hypothesized that administration of a single dose might be sufficient for the beneficial effect. For this purpose, the dose of 10 mg/kg of Pioglitazone was administered at two time points: 24 hours after extinction and 30 minutes before the test day. The results obtained showed that neither of the two doses was able to reverse the effects of stress on the impaired consolidation of the extinction. Besides, the PPAR α receptor agonist (Fenofibrate) was tested at the same doses, and it did not demonstrate beneficial effect on the impaired fear response to stressed animals. The use of antagonists of the same receptors (GW9662 and GW6457) at a dose of 2 mg/kg did not show any effect, confirming that receptor activation is necessary for the observed effect. Therefore, the results experimentally demonstrate that the administration of Pioglitazone, a PPAR γ receptor agonist, over a period of 7 days at a dose of 10 mg/kg, is capable of reversing the deleterious effect of stress, as represented by the decrease in the animal's freezing percentage to levels similar to those of animals that did not undergo any stressful event.

Keywords: Post traumatic stress disorder, PPAR receptors, contextual fear conditioning, Stress, PPAR γ

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência de estímulos estressores aplicados no modelo de Estresse Reestresse (SRS).

Figura 2. Representação esquemática das quatro sessões do protocolo de medo condicionado ao contexto empregados neste estudo, consistindo de habituação, condicionamento, extinção e teste de retenção.

Figura 3. Esquema do protocolo de SRS e MCC empregado no presente estudo e utilizado nos experimentos de padronização do modelo. (Imagem criada por meio do aplicativo Biorender®)

Figura 4. Esquema do protocolo de SRS e MCC empregado no presente estudo demonstrando o momento e frequência da aplicação do agonista PPAR γ . (Imagem criada por meio do aplicativo Biorender®)

Figura 5. Esquema do protocolo de SRS e MCC empregado no presente estudo demonstrando o momento e aplicação aguda do agonista PPAR γ . (Imagem criada por meio do aplicativo Biorender®)

Figura 6. Esquema do protocolo de SRS e MCC empregado no presente estudo demonstrando o momento e frequência da aplicação do agonista PPAR α . (Imagem criada por meio do aplicativo Biorender®)

Figura 7. Esquema do protocolo de SRS e MCC empregado no presente estudo demonstrando o momento e frequência da aplicação dos antagonistas PPAR α e PPAR γ . (Imagem criada por meio do aplicativo Biorender®)

Figura 8. Perfil temporal de condicionamento, extinção e teste de retenção da memória de medo condicionado ao contexto em ratos submetidos a diferentes protocolos de intensidade de choque demonstrando que os animais estressados e condicionados na intensidade de 0,65mA apresentam prejuízo na capacidade de extinção da memória de medo condicionado ao contexto. Os animais foram divididos entre os grupos experimentais Controle 0,45 mA (n= 5), estressados 0,45 mA (n=5), Controle 0,65 mA (n= 6) e estressados 0,65 mA (n=5). Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) pelo tempo total de 10min, 30min. e 5min. para o condicionamento, extinção e teste, respectivamente. * *Posthoc* de Tukey indica valor de $p = 0,0010$ quando comparado com animais controle 0,65mA.

Figura 9. Expressão do medo condicionado ao contexto (5min. iniciais da sessão de extinção) em animais estressados e não estressados submetidos a diferentes protocolos de intensidade de

choque nas patas. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm erro Padrão da Média (EPM) avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com controle 0,65mA.

Figura 10. Últimos 5min. da sessão de extinção do medo condicionado ao contexto de animais estressados e não estressados submetidos a diferentes protocolos de intensidade de choque nas patas **(A)** e sessão de teste de retenção da memória de extinção **(B)** Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com todos os outros grupos experimentais **(A)** ou apenas com o grupo controle 0,65mA **(B)**. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com controle 0,65mA.

Figura 11. Ratos Wistar expostos ao teste do campo aberto ao final do protocolo estabelecido não apresentaram mudanças nos parâmetros comportamentais observados quando comparados com seus respectivos controles da intensidade de choque. Os animais foram distribuídos entre os grupos controle 0,45mA (n=6), SRS 0,45mA (n=5), controle 0,65 (n=5) e SRS 0,65 (n=6). **A)** distância em metros (m) percorrida pelo animal na arena **B)** tempo total em segundos (s) em que o animal permaneceu imóvel no aparato **C)** tempo total em segundos (s) de permanência no centro do aparato, **D)** tempo total em segundos (s) de permanência periferia, **E)** número absoluto de entradas na porção central, **F)** número absoluto de entradas na periferia da arena. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM e foram submetidos à ANOVA *one-way*.

Figura 12. Perfil temporal de condicionamento, extinção e teste de retenção da memória de extinção do medo condicionado ao contexto de ratos Wistar submetidos a diferentes formas de agrupamento demonstrando prejuízo na extinção da memória de medo condicionado ao contexto em animais previamente estressados. Os animais foram divididos entre os grupos experimentais agrupado (n= 9), isolado (n=10) e estressados e isolados (n=11). Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) pelo tempo total de 10min., 30min. e 5min. para o condicionamento, extinção e teste, respectivamente. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p = 0,0003$ quando comparado com o grupo isolado; # * *posthoc* de Tukey indica valor de $p = 0,0003$ quando comparado com o grupo agrupado.

Figura 13. Expressão do medo condicionado ao contexto (5min. iniciais da sessão de extinção) de animais controles que permaneceram agrupados ou que foram isolados 7 dias após a sessão de extinção e animais estressados. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm

Erro Padrão da Média (EPM) avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com controle agrupado; # * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com animais isolados.

Figura 14. Últimos 5min. da sessão de extinção do medo condicionado (A) e dia do teste de retenção da memória de extinção (B) de animais controles que permaneceram agrupados ou que foram isolados 7 dias após a sessão de extinção e animais estressados. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) avaliados nos últimos cinco minutos da sessão de extinção e no dia do teste. * * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com controle agrupado; # * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com animais isolados.

Figura 15. Ratos Wistar expostos ao teste do campo aberto 18 dias após serem submetidos ao protocolo de estresse-reestresse seguido do modelo de medo condicionado ao contexto apresentaram mudanças em alguns dos parâmetros comportamentais observados comparados com animais controle. Os animais foram distribuídos entre os grupos agrupado, isolado e SRS (estresse-reestresse). A) distância (m) percorrida pelo animal na arena B) tempo (s) total em que o animal permaneceu imóvel no aparato C) tempo (s) dispendido no centro do aparato e D) na periferia E) número absoluto de entradas na porção central F) e na periferia da arena. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM e foram submetidos à ANOVA *one-way*. * * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ comparado com grupo agrupado, # * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ comparado com grupo isolado.

Figura 16. Perfil temporal de condicionamento, extinção e teste de retenção da memória de extinção do medo condicionado ao contexto de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de Pioglitazona (doses 0,1, 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (DMSO + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. A pioglitazona na maior dose foi capaz de reverter o prejuízo na consolidação da memória de extinção causado pelo estresse. Os animais foram divididos entre os grupos experimentais controle + veículo (n= 7), controle SRS + veículo (n=7), Pioglitazona na dose de 0,1 mg/kg (n=6), 1 mg/kg (n=6) e 10 mg/kg (n=7). Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) pelo tempo total de 10 min, 30min e 5min para o condicionamento, extinção e teste, respectivamente. * * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle SRS; # * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com os grupos Pioglitazona 0,1 e 1 mg/kg.

Figura 17. Expressão do medo condicionado ao contexto (5min iniciais da sessão de extinção) **(A)** e últimos 5 minutos da sessão de extinção do medo condicionado **(B)** de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de Pioglitazona (doses 0,1, 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (DMSO + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) que foram avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * * *posthoc* de Tukey indica $p < 0.05$ com relação ao grupo controle.

Figura 18. Últimos 5min da sessão de extinção do medo condicionado **(A)** e dia do teste de retenção da memória de extinção **(B)** de animais de ratos Wistar que receberam administração subcrônica intraperitoneal de Pioglitazona (doses 0,1, 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (DMSO + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) avaliados nos últimos cinco minutos da sessão de extinção e no dia do teste. * * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com controle; # *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com controle SRS

Figura 19. Ratos Wistar expostos ao teste do campo aberto 18 dias após serem submetidos ao protocolo de estresse-reestresse seguido do modelo de medo condicionado ao contexto não apresentaram mudanças nos parâmetros comportamentais observados quando receberam administração subcrônica intraperitoneal de Pioglitazona (doses 0,1, 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (DMSO 1% + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Os animais foram distribuídos entre os grupos controle (n= 4), controle SRS (n=5), Pioglitazona na dose de 0,1 mg/kg (n=5), 1 mg/kg (n=5) e 10 mg/kg (n=5) **A)** distância (m) percorrida pelo animal na arena **B)** tempo (s) total em que o animal permaneceu imóvel no aparato **C)** tempo (s) dispendido no centro do aparato e **D)** na periferia **E)** número absoluto de entradas na porção central **F)** e na periferia da arena. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM e foram submetidos à ANOVA *one-way*.

Figura 20. Perfil temporal de condicionamento, extinção e teste de retenção da memória de extinção do medo condicionado ao contexto de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de Pioglitazona (10 mg/kg) ou veículo (DMSO 1% + Tween 80) 24h após a sessão de extinção ou 30 minutos antes do dia do teste. Na condição de administração aguda a Pioglitazona teve sua capacidade de reverter os efeitos deletérios do estresse prévio ao condicionamento ao contexto anulada. Os animais foram divididos entre os grupos experimentais controle (n= 9), controle SRS (n=9), Pioglitazona administrada 24h após a

extinção (n=13) e Pioglitazona administrada 30 min. antes da sessão de teste (n=13). Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) pelo tempo total de 10min, 30min e 5min para o condicionamento, extinção e teste, respectivamente. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando os grupos SRS, Pioglitazona dia 1 e Pioglitazona dia 7 foram comparados com o grupo controle

Figura 21. Expressão do medo condicionado ao contexto (5min iniciais da sessão de extinção) (A) e últimos 5 minutos da sessão de extinção do medo condicionado (B) de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de Pioglitazona (10 mg/kg) ou veículo (DMSO 1% + Tween 80) 24h após a sessão de extinção ou 30 minutos antes do dia do teste. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) que foram avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle

Figura 22. Últimos 5min da sessão de extinção do medo condicionado (A) e dia do teste de retenção da memória de extinção (B) de animais de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de Pioglitazona (10 mg/kg) ou veículo (DMSO 1% + Tween 80) 24h após a sessão de extinção ou 30min. antes do dia do teste. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) que foram avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

Figura 23. Perfil temporal de condicionamento, extinção e teste de retenção da memória de extinção do medo condicionado ao contexto de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de Fenofibrato (doses 0,1, 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (DMSO 10% + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Nenhuma das doses testadas de Fenofibrato foi capaz de causar efeito de redução do percentual de *freezing* de animais estressados previamente ao condicionamento ao contexto. Os animais foram divididos entre os grupos experimentais controle (n= 7), controle SRS (n=7), Fenofibrato na dose de 0,1 mg/kg (n=6), 1 mg/kg (n=6) e 10 mg/kg (n=6). Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) pelo tempo total de 10min, 30 min e 5min para o condicionamento, extinção e teste, respectivamente. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle SRS; # *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com os grupos Fenofibrato 0,1 e 1 mg/kg.

Figura 24. Expressão do medo condicionado ao contexto (5min iniciais da sessão de extinção) **(A)** e últimos 5 minutos da sessão de extinção do medo condicionado **(B)** de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de Fenofibrato (doses 0,1, 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (DMSO 10% + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) que foram avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle não estressado + veículo.

Figura 25. Últimos 5min da sessão de extinção do medo condicionado **(A)** e dia do teste de retenção da memória de extinção **(B)** de animais de ratos Wistar que receberam administração subcrônica intraperitoneal de Fenofibrato (doses 0,1, 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (DMSO + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) avaliados nos últimos cinco minutos da sessão de extinção e no dia do teste. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com controle não estressado.

Figura 26. Ratos Wistar expostos ao teste do campo aberto 17 dias após serem submetidos ao protocolo de estresse-reestresse seguido do modelo de medo condicionado ao contexto não apresentaram mudanças em nenhum dos parâmetros comportamentais observados. Os animais foram distribuídos entre os grupos Controle (n=6), controle SRS (n=6), Fenofibrato 0,1 mg/kg (n=6), Fenofibrato 1 mg/kg (n=6), Fenofibrato 10 mg/kg (n=7). **A)** distância (m) percorrida pelo animal na arena **B)** tempo (s) total em que o animal permaneceu imóvel no aparato **C)** tempo (s) dispendido no centro do aparato e **D)** na periferia **E)** número absoluto de entradas na porção central **F)** e na periferia da arena. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM.

Figura 27. Perfil temporal de condicionamento, extinção e teste de retenção da memória de extinção do condicionado ao contexto de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de GW9662 ou GW6471 (dose 2 mg/kg) ou veículo (DMSO 1% ou 10% + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Nenhuma das doses testadas dos antagonistas foi capaz de causar efeito de redução do percentual de *freezing* de animais estressados previamente ao condicionamento ao contexto. Os animais foram divididos entre os grupos experimentais controle (n= 8), controle SRS (n=8), GW9662 (n=7) e GW6471 (n=6). Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) pelo tempo total de 10min, 30min e 5min para o condicionamento, extinção e teste, respectivamente. *

posthoc de Tukey indica que os grupos controle, SRS, GW9662 e GW6471 obtiveram valor de $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

Figura 28. Expressão do medo condicionado ao contexto (5min iniciais da sessão de extinção) **(A)** e últimos 5 minutos da sessão de extinção do medo condicionado **(B)** de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de GW9662 ou GW6471 (dose 2 mg/kg) ou veículo (DMSO 1% ou 10% + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) que foram avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

Figura 29. Últimos 5min da sessão de extinção do medo condicionado **(A)** e dia do teste de retenção da memória de extinção **(B)** de animais de ratos Wistar que receberam administração subcrônica intraperitoneal de GW9662 ou GW6471 (dose 2 mg/kg) ou veículo (DMSO 1% ou 10% + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) que foram avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

Figura 30. Ratos Wistar expostos ao teste do campo aberto 17 dias após serem submetidos ao protocolo de estresse-reestresse seguido do modelo de medo condicionado ao contexto não apresentaram mudanças em nenhum dos parâmetros comportamentais observados. Os animais foram distribuídos entre os grupos Controle (n=6), controle SRS (n=6), GW9662 (n=5) e GW6471 (n=6). **A)** distância (m) percorrida pelo animal na arena **B)** tempo (s) total em que o animal permaneceu imóvel no aparato **C)** tempo (s) dispendido no centro do aparato e **D)** na periferia **E)** número absoluto de entradas na porção central **F)** e na periferia da arena. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado da análise *posthoc* de Tukey comparando o primeiro e os dois últimos minutos da sessão de condicionamento ao contexto de grupos controle e estressados submetidos a diferentes intensidades de condicionamento.

Tabela 2. Resultado da análise *posthoc* de Tukey comparando o primeiro e os dois últimos minutos da sessão de condicionamento ao contexto de grupos controle e estressados submetidos a diferentes formas de agrupamento.

Tabela 3. Resultado da análise *posthoc* de Tukey comparando o primeiro e os dois últimos minutos da sessão de condicionamento ao contexto de grupos controle e estressados que receberam a administração de veículo ou Pioglitazona em diferentes doses por sete dias após a sessão de extinção.

Tabela 4. Resultado da análise *posthoc* de Tukey comparando o primeiro e os dois últimos minutos da sessão de condicionamento ao contexto de grupos controle e estressados que receberam a administração de Pioglitazona (10mg/kg) 24h após a sessão de extinção ou 30min antes da sessão de teste.

Tabela 5. Resultado da análise *posthoc* de Tukey comparando o primeiro e os dois últimos minutos da sessão de condicionamento ao contexto de grupos controle e estressados que receberam a administração de veículo ou Fenofibrato em diferentes doses por sete dias após a sessão de extinção.

Tabela 6. Resultado da análise *posthoc* de Tukey comparando o primeiro e os dois últimos minutos da sessão de condicionamento ao contexto de grupos controle e estressados que receberam a administração de GW9662 ou GW6471 por sete dias após a sessão de extinção.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2-AG – 2-Arachidonoylglycerol

AA – Arachidonic Acid

AEA - Anandamide

ACTH – Hormônio adrenocorticotrópico

AMPA – alpha-amino-3-hydroxi-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

Amg – Amígdala/Complexo amigdalóide

ANOVA – Analysis of Variance

AP-1 – Proteína ativadora 1

BLA – Amígdala Basolateral

CB1 – Cannabinoid Receptor type 1

CB2 - Cannabinoid Receptor type 2

CBD - cannabidiol

CeA – Amígdala Central

COX-2 – Ciclo-oxigenase tipo 2

CPFm – Córtex Pré-frontal medial

CREB – Proteína de ligação ao elemento de resposta AMP cíclico

CRH – Hormônio Regulador de Corticotropina

dACC – Córtex Cingulado anterior dorsal

DHA – Ácido docosahexaenóico

DMSO – Dimethyl Sulfoxide

DSM – do inglês Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

FAAH – fatty acid amide hydrolase

FDA – do inglês Food and Drugs Administratio

GAS – do inglês *General Adaptation syndrome*

GLT-1 Transportador de glutamato 1

GR – Receptores glicocorticóides

GPRs – non-cannabinoid G-protein coupled receptors

HPC – Hipocampo

IC – Córtex insular

ICAM-1 – Intercellular Adhesion Molecule 1

IL-1 – Interleucina 1

IL-2 - Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-12 - Interleucina 12

IL – porção infralímbica do córtex pré-frontal

iNOS – Óxido nítrico síntase induzível

ISRS – Inibidor Seletivo Da Recaptação De Serotonina

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

LPS – Lipopolisacarídeos

MAGL – Monoacylglycerol Lipase

MC2R – Melanocortin 2 Receptor

MCC – medo condicionado ao contexto

MR – Receptores mineralocorticóides

mRNA – RNA mensageiro

mTOR – do inglês Mechanistic Target of Rapamycin

NF-κB – Fator nuclear κB

NMDA – N-metil-D-Aspartic acid

OFC – Córtex orbitofrontal

PEA – ácido eicosapentaenóico

PL – Porção pré-límbica do córtex pré-frontal

Star – Steroidogenic Acute regulatory protein

SNP – Sistema nervosa periférico

SNC – Sistema nervoso central

SRS – Estresse-Reestresse

STAT-1 – Signal Transducer and Activator of Transcription 1

PGC-1 α - Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma coactivator-1 α

PI3K – Phosphatidylinositol-3 kinase

PPAR α – Receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos α

PPAR β/δ – Receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos β/δ

PPAR γ – Receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos γ

PRREs – do inglês Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Response Element

POMC - Propiomelanocortin

PTSD – *post traumatic stress disorder*

RXR – Retinoid X Receptor

TCA – Teste do Campo Aberto

TEPT – Transtorno do estresse pós-traumático

TLR4 – Receptor do tipo toll-like 4

TNF – Teste do nado forçado

TNF- α - Fator de necrose tumoral

TRPV – Transient Receptor Potential Vanilloid

TRPV1 - Transient Receptor Potential Vanilloid subtype 1

vmCPF - Córtex Pré-frontal ventromedial

VCAM-2 – Vascular Cell Adhesion Molecule 2

VTA – Área tegmentar ventral

WMH – do inglês World Mental Health

SUMÁRIO

1. Introdução	30
1.1 Breve representação do Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT) na literatura e na história	31
1.2 O Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT).....	35
1.3 A memória como alvo dos estudos do TEPT: o modelo do medo condicionado	37
1.4 O Estresse como fator desencadeador do TEPT.....	42
1.5 O receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos (PPAR) como um alvo intracelular no tratamento das alterações encontradas no TEPT	47
2. Objetivos.....	53
2.1 Objetivo Geral	54
2.2 Objetivos Específicos	54
3. Materiais e Métodos	55
3.1 Animais.....	56
3.2 Drogas.....	56
3.4 Análise Comportamental.....	58
3.4.1 Paradigma do Medo Condicionado ao Contexto.....	58
3.4.2 Teste do campo aberto.....	59
3.5 Protocolos Experimentais.....	60
3.6 Análises Estatísticas.....	67
4. Resultados.....	69
4.1 Padronização do modelo de Estresse-Reestresse	70
4.2 Efeito da administração sistêmica de agonista PPAR γ na resposta de medo condicionado ao contexto em animais submetidos ao modelo de SRS	86
4.3 Efeito da administração aguda sistêmica de agonista PPAR γ na resposta de medo condicionado ao contexto em animais submetidos ao modelo de SRS.....	93

4.4 Efeito da administração sistêmica de agonista PPAR α na resposta de medo condicionado ao contexto em animais submetidos ao modelo de SRS	99
4.5 Efeito da administração sistêmica de antagonista PPAR γ e PPAR α na resposta de medo condicionado ao contexto em animais submetidos ao modelo de SRS.....	108
5. Discussão	116
6. Conclusão	126
7. Referências Bibliográficas	128
ANEXO A	156

1. Introdução

1.1 Breve representação do Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT) na literatura e na história

Desde o momento em que os seres humanos passaram a nutrir um sentimento de posse e de dominação sobre outros humanos tem-se escassos relatos na literatura sobre os sintomas comportamentais que acompanham o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT). Grande parte desse repertório está descrito em registros antropológicos que datam de períodos conturbados envoltos em cenários de guerras travadas entre as diferentes civilizações antigas que habitaram nos continentes. Até o presente momento o relato mais antigo de um dos sintomas presentes no TEPT data de 4000 anos atrás, compreendendo o período de 2027 a 2003 a.C, momento esse onde os povos que ocupavam a região de Ur na antiga mesopotâmia sofreram uma invasão dos elamitas e, por meio de escritas cuneiformes e traduzido originalmente da placa de pedra, está registrado um trecho em que é possível distinguir as consequências do trauma (Kucmin et al, 2016):

“The Sumerians and the Elamites, the destroyers, made of it thirty shekels. The righteous house they break up with pickaxe; the people groan. The city they make into ruins; the people groan. Its lady cries: “Alas for my city”, cries: “alas for my house”. In its lofty gates, where they were wont to promenade, dead bodies were lying about; In its boulevards, where the feasts were celebrated, scattered they lay. In all its streets, where they were wont to promenade, dead bodies were lying about; In its places, where the festivities of the land took place, the people lay in heaps. At night a bitter lament having been raised unto me, I, although, for that night I tremble, Fled not before that night’s violence. The storm’s cyclone like destruction – verily its terror has filled me full. Because of its [affliction] in my nightly sleeping place, In my nightly sleeping place verily there is no peace for me.” (KRAMER SN, 1969, versos 95-99)

Nesses versos é possível constatar a turbulência de sentimentos e de emoções passadas pelo autor do texto ao descrever o sentimento de um povo ao ver todas as suas casas destruídas, objetos sitiados e diversos corpos de pessoas mortas estirados em locais da cidade que antes eram utilizados para a realização de festividades. À medida que o autor prossegue com seu lamento há a descrição de como suas noites de sono passaram a ser acometidas por constantes aflições e distresses (cunhado por Selye em 1950 e considerado um estresse que afeta o

organismo de forma negativa), deixando de serem pacíficas e normais. Tais sintomas são comuns em pessoas que passaram por eventos traumáticos intensos.

Outros relatos de trauma podem ser encontrados em trechos do poema épico ‘Os ilíadas’ escrito por Homero e que narra eventos que ocorreram durante a guerra de tróia. Ao longo da narrativa Aquiles sente culpa pela morte dos seus companheiros e apresenta características de uma pessoa enlutada, como sentimento de tristeza e culpa, além de aparentar ter desenvolvido um trauma sobre os eventos vivenciados (Kucmin et al, 2016):

‘...but Achilles still wept for thinking of his dear comrade, and sleep, before whom all things bow, could take no hold upon him... As he dwelt on these things he wept bitterly and lay now on his side, now on his back, and now face downwards, till at last he rose and went Out as one distraught to wander upon the sea-shore. I would die here and now, in that I could not save my comrade. He has fallen far from home, and in his hour of need my hand was not there to help him. What is there for me? Return to my own land I shall not, and I have brought no saving neither to Patroclus nor to my other comrades of whom so many have been slain by mighty Hector; I stay here by my ships a bootless burden upon the Earth.’
(Homero, Os ilíadas. Livro 8 versos 97-101)

Relatos do impacto do trauma na vida das pessoas também podem ser encontrados na peça histórica de William Shakespeare ‘Henrique IV’ (Kucmin et al, 2016) onde um dos personagens chamado Hotspur, valente jovem guerreiro pertencente à nobre família Percy que ajudou Henrique IV a alçar o poder do reino, é confrontado por sua esposa a fim de tentar entender a mudança em seu comportamento após as inúmeras guerras travadas ao longo das cruzadas contra os povos galeses do Oeste e escoceses do norte:

“Por que te achas tão só, querido esposo? Que fiz eu para estar há uma quinzena exilada do leito do meu Harry? Conta-me, esposo amado, qual a causa que de todo te priva do apetite, da alegria e do sono da inocência? Por que os olhos assim cravas na terra, e estremecees amiúde, quando ficas sozinho? Por que o sangue rubicundo das faces te fugiu? Por que assim trocas meu tesouro e o direito sobre ti, pela meditação de olhar sombrio e essa melancolia amaldiçoada? Observando-te o sono tão inquieto, ouvi-te murmurar de lutas férreas e incitar teu cavalo irrefreável com gritos de “Coragem!” “Para a frente!” Falavas de saídas, retiradas, barracas e trincheiras, paliçadas, fortins e parapeitos, basiliscos, canhões e colubrinhas, de soldados sem vida, de resgates, e de quanto um combate ardente integra. Tanto, dentro de ti, se achava em guerra teu espírito, e tanto te agitava que o suor, em bagas, te banhava a frente como bolhas em riacho remexido. Estranhas contrações tu revelavas no rosto, talqualmente essas pessoas que o fôlego detêm, quando no ponto de súbita empresa. Que

presságios são esses? Meu senhor tem algo em mente, que vai dizer-me; a menos que não me ame” (Shakespeare, Henrique IV. 1597, ato 2 cena 3.)

Saindo do universo mais tradicional e épico da escrita e dos relatos históricos e partindo para uma perspectiva mais moderna dos diferentes aspectos dos sintomas do TEPT envolvendo principalmente o trauma, tem-se, dentre inúmeros autores e obras, Virginia Woolf, escritora moderna e pioneira do feminismo no século XX, com a sua obra ‘*Mrs. Dalloway*’ trazendo dentro da narrativa a vivência de ex-soldados ingleses que sobreviveram ao terror da I Guerra Mundial e que convivem com as sequelas disso no período de paz posterior a esse evento histórico. Nela o personagem Septimus Warren Smith é um jovem veterano de guerra que tem a sua vida pós I Guerra Mundial prejudicada pelo que ficou conhecido na época como *shell shock* (traduzido como neurose de guerra). Septimus experimenta memórias recorrentes do ambiente de guerra cirurgicamente representadas pela confusão feita pelo personagem ao ouvir o barulho da descarga de um carro e confundir com tiros ao andar por uma rua movimentada de Londres. À medida que a história prossegue é possível perceber a apatia com sentimentos alheios, incluindo os de sua própria esposa, o sentimento de grandeza, muitas vezes messiânico, como o de um grande herói, e o terror sentido tanto acordado quanto dormindo, vivendo em um universo que mescla seus maiores pesadelos com a realidade, onde ele não se sente compreendido por ninguém, isolando-se da sociedade, e revivendo constantemente o seu passado de guerra manchado de sangue e de corpos dos seus companheiros (Woolf, 1980).

Na vida e na literatura contemporânea existem inúmeras narrativas que referenciam o fator trauma como um evento capaz de modificar o padrão comportamental de alguém, demonstrando as consequências disso no cotidiano das pessoas. A título de exemplo pode-se citar os títulos de romances que envolvem distopias ou em momentos de grandes crises humanitárias onde é possível encontrar relatos de que a experiência com eventos traumáticos pode levar à alterações na qualidade de vida e saúde mental, podendo ser representadas como perturbações durante o sono, pesadelos recorrentes, memórias intrusivas principalmente

envolvendo o evento traumático vivenciado, raiva ou excitação constante, distúrbios de humor e a tentativa de evitar lugares ou situações que relembrem o trauma. Todos os sintomas citados estão associados ao desenvolvimento de TEPT e costumam ser apresentados aos leitores de obras fictícias em algum momento da vida dos protagonistas que sobrevivem a situações de vida ou morte ou até mesmo ao testemunhar a morte de entes queridos ou pessoas próximas a eles como, por exemplo, nas séries de livros Jogos Vorazes, da escritora americana Suzanne Collins, Harry Potter, da escritora J.K. Rowling, e também em Divergente, de Veronica Roth.

Mais recente ainda tivemos uma das maiores crises sanitária e humanitária do século XXI, a Pandemia causada pelo vírus da família do coronavírus SARS-CoV-2 e responsável pela síndrome respiratória aguda grave, também denominada como doença da COVID-19. Tendo o primeiro caso sido registrado no final de 2019, a infecção pelo vírus sofreu uma rápida escalada em números de casos confirmados e de óbitos em diferentes países à medida que o tempo passava, atingindo mais de 700 milhões de casos confirmados e cerca de 6,8 milhões de óbitos até o momento (WHO, 2022). Esses números acenderam o alerta para uma pandemia, o que levou todos os países a recorrerem à políticas de lockdown, estado de quarentena, isolamento social, fechamento de aeroportos e proibição de qualquer evento que gerasse aglomeração de pessoas como medidas de prevenção e de contenção da disseminação do vírus (Santomauro, Herrera e Shadid, 2021). Todas essas medidas geraram uma série de preocupações, medos e incertezas na vida da população mundial, prejudicando o estado de bem-estar psicossocial mundial (Santomauro, Herrera e Shadid, 2021; Dubey et al, 2020). Desse modo, até os dias atuais estuda-se o impacto da pandemia na saúde mental dos pacientes, profissionais de saúde e de diferentes tipos de populações considerando que durante esse período foram constatados altos níveis de ansiedade, alterações de humor e de sono, comportamento obsessivo compulsivo e até mesmo TEPT quando comparados com momentos pré-pandêmicos (Chamaa et al, 2021;

Sun et al, 2020; Wang e Wang, 2023; Santomauro, Herrera e Shadid, 2021; Ahmed et al, 2020; Marvaldi et al, 2021)

Em síntese, eventos traumáticos acompanham a humanidade há séculos e nunca puderam ser tão bem definidas e caracterizadas como o é atualmente, tendo seus critérios nosológicos melhorados e modificados à medida que o conhecimento sobre a psicopatologia evolui (Vance e Howell, 2020; Sbardelloto et al, 2011). É válido ressaltar que durante muito tempo não havia uma definição muito precisa do que hoje é caracterizado como transtorno do estresse pós-traumático, apenas relatava-se os sintomas que acometiam os indivíduos possivelmente portadores dessa síndrome baseado numa percepção empírica, sem o viés do conhecimento científico que se detém atualmente.

1.2 O Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT)

Atualmente o Transtorno do Estresse Pós-traumático (TEPT) é considerado um transtorno psiquiátrico que, por meio de um conjunto de sintomas característicos, pode chegar a ser debilitante. Segundo a World Mental Health (WMH), estima-se que cerca de 70% da população mundial já foi exposta a algum tipo de trauma e aproximadamente em média 6% dos indivíduos expostos a esses traumas desenvolveram o TEPT, variando de acordo com a região analisada. Essa prevalência acaba sendo maior em populações específicas que apresentam alto grau de exposição a eventos considerados traumáticos ao longo da vida, como abuso sexual, desastres naturais, acidentes com veículos, estupro, veteranos de guerra expostos ao combate, dentre outros.

Na primeira edição do Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-I) existia uma definição primária e pouco polida para diagnosticar pacientes que apresentavam alterações de comportamento devido ao fato de terem passado por eventos estressores intensos como, por exemplo, sobreviventes de guerras e de catástrofes naturais. Nesse caso, os pacientes eram enquadrados nos critérios da categoria de reação grave ao

estresse na extinta seção de distúrbio situacional transitório de personalidade, contudo esse diagnóstico inicial não evoluía para o TEPT como é conhecido atualmente (Alvarenga et al, 2009; North et al, 2016). Ao publicar o DSM-II, essas categorias foram extintas e os sintomas relacionados a eventos traumáticos passaram a ser classificados como reação de ajustamento à vida adulta na seção de distúrbio situacional transitório (Andreasen, 2011; North et al, 2016). Ambas classificações previstas nas duas primeiras edições do DSM apresentavam categorias muito gerais, ocasionando conflito de diagnóstico para os diversos casos de reações pós-traumáticas, além de atribuir para esses distúrbios um caráter transitório e agudo que necessitaria de um segundo diagnóstico mais preciso caso os sintomas apresentassem cronicidade (Câmara Filho e Sougey, 2001; North et al, 2016).

A primeira aparição do TEPT formalmente como uma categoria de doença mental aconteceu no Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 3ª edição (DSM-III), já que nas edições anteriores haviam inúmeras inconsistências nos critérios e pouco conhecimento a respeito dessa psicopatologia. Dessa edição em diante ocorreu uma série de modificações e reformulação dos critérios diagnósticos antigos, visando auxiliar no diagnóstico clínico dos transtornos mentais e no planejamento estatístico por clínicos e pesquisadores da área. Sendo assim, o TEPT passou a ser integrado ao conjunto de transtornos de ansiedade, foi definido de forma inicial o conceito de trauma como um fenômeno estressor reconhecível capaz de evocar sintomas significativos de distresse em praticamente todos os indivíduos e também a organização dos diferentes sintomas em três grandes conjuntos denominados sintomas de re-experiência, entorpecimento e de esquiva e excitação (Alvarenga et al, 2009; Andreasen, 2011; North et al, 2016). Desse momento em diante o fenômeno fisiológico do ‘estresse’ passa a ser incluído nos jargões da psicologia para denominar o trauma como o evento estressor capaz de desencadear o TEPT (Câmara Filho e Sougey, 2001; North et al, 2016). As edições posteriores apenas trataram de realizar algumas atualizações com base no avanço da literatura científica

referentes ao conceito de trauma, seus diferentes tipos e sobre os critérios de exposição que passaram a considerar também a resposta subjetiva do indivíduo ao evento estressor, além disso foram incluídos novos sintomas enquanto outros foram reformulados (Câmara Filho e Sougey, 2001; North et al, 2016; Sbardelloto et al, 2011)

De acordo com a quinta e última edição do Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) os sintomas presentes no TEPT estão agrupados em quatro grandes conjuntos (*clusters*) que são: sintomas de intrusão ou reexperiência do trauma, sintomas de esquiva, sintomas negativos na cognição e humor e hiperexcitação. Dentro desses *clusters* uma série de sintomas-chave podem estar presentes nos indivíduos portadores do transtorno, tendo como pré-requisito a apresentação de pelo menos um dos sintomas dentro de cada conjunto para que o indivíduo tenha como diagnóstico definitivo o TEPT. Desse modo, o principal sintoma do TEPT envolve a incapacidade de extinguir respostas comportamentais que estão associadas aos estímulos relacionados com o evento traumático (Kirkpatrick e Heller, 2014). Em decorrência disso, uma série de sintomas podem acompanhar esses pacientes em associação com a apresentação de memórias intrusivas, angustiantes e involuntárias em suma relacionadas ao evento traumáticos, podendo ser sonhos que causam grande aflição, comportamento dissociativo, aversão a situações relacionadas ao trauma, aumento na ansiedade, humor e memória muitas vezes debilitados, aumento na excitabilidade e irritabilidade, além do sentimento de perigo constante (Kirkpatrick e Heller, 2014).

1.3 A memória como alvo dos estudos do TEPT: o modelo do medo condicionado

A sintomatologia por trás do TEPT compreende intenso medo associado a ambientes ou situações que os portadores da desordem venham a vivenciar no seu cotidiano. Em situações fisiológicas normais, o medo pode ser evocado a partir de estímulos inatos ou estímulos previamente aprendidos e ocorre como uma forma do organismo animal preparar-se frente a uma situação que representa um perigo em potencial, garantindo a sobrevivência e diminuindo

possíveis prejuízos (LeDoux, 2014; LeDoux, 2017, Raber et al., 2019). Quando esse medo é aprendido forma-se uma associação da resposta de medo com o estímulo aversivo de tal modo que no momento em que o organismo for exposto novamente à mesma situação aversiva será desencadeada a mesma série de respostas fisiológicas, emocionais e comportamentais desencadeadas pela memória de medo criada (Tovote et al., 2015; Fendt e Fanselow, 1999; Ledoux, 2000; Maren, 2001). A ocorrência do TEPT após um evento traumático está intimamente associada a alterações na formação de memórias de medo, visto que nesse transtorno existe uma dificuldade na capacidade de extinguir memórias ligadas ao trauma.

Uma característica comum às doenças neuropsiquiátricas é o comprometimento em algum grau nos processos que envolvem a memória (Crawford e Loprinzi, 2020). A memória pode ser classificada segundo o seu tempo e duração de armazenamento na forma de memória de trabalho, de curta duração ou de longa duração. A memória de trabalho atua filtrando as informações existentes no cérebro e definindo o que é novo e o que já existe. A memória de curta duração armazena informações por cerca de 6h até que as mesmas estejam preparadas para serem reutilizadas ou sejam armazenadas de forma definitiva na memória de longa duração (podendo ser armazenada por anos) (Alberini e Ledoux, 2013; Kida, 2019).

A formação memória de longa duração necessita de algumas etapas para que seja devidamente armazenada. A primeira fase é a aquisição, o momento de contato inicial com a informação nova (a aprendizagem de algo). Após isso, a informação pode ser consolidada, processo onde a informação é armazenada de forma estável (Bisaz et al., 2004; Izquierdo, 2018; Johansen et al., 2011; Kensinger e Ford, 2020). Em seguida, essa memória armazenada pode ser recrutada pela fase de evocação. A partir desse momento a memória pode percorrer dois caminhos, ser reconsolidada com a aquisição de novas informações sobre a memória pré-existente, ou ser extinta, processo no qual a memória antiga é inibida ao ser sobreposta por uma nova (Alberini e Ledoux, 2013; Elsey et al., 2018; Izquierdo, 2018; Kida, 2019).

Um dos modelos animais bem empregado no estudo dos mecanismos por trás do TEPT é o modelo de medo condicionado estipulado por Ivan Pavlov em 1927 no seu clássico trabalho sobre reflexos condicionados. De forma resumida, o modelo de condicionamento pavloviano estabelece que a resposta inata do animal a certos estímulos externos (estímulo não-condicionado) pode ser associada com um estímulo neutro, levando a formação de uma resposta condicionada. Assim, o estímulo condicionado pode ser representado na forma de ambientes (contextos), estímulos sonoros emitidos por equipamentos específicos ou cheiros, por exemplo. Esse pressuposto é a base da capacidade de aprender a ter medo de pessoas, locais, objetos e etc. No contexto do modelo Pavloviano, muitos avanços foram feitos possibilitando uma melhor compreensão das regiões cerebrais envolvidas nas respostas condicionadas ao medo (Kida, 2018; Tovote, 2015; Phillips e LeDoux, 1992).

Atualmente, é extremamente solidificado em literatura científica a participação de algumas estruturas chaves, mas não exclusivas, como a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal medial (CPFm) nos processos de medo condicionado principalmente pelo fato de essas estruturas formarem uma rede neural intimamente relacionada com processos que envolvem a formação de novas memórias e de respostas comportamentais associadas a elas (Beck e Fibiger, 1995a; Beck e Fibiger, 1995b; Johansen et al., 2011; LeDoux, 2014; LeDoux, 2017; Raber et al., 2019; Smith et al., 1992; Sotres-bayon et al., 2016).

O núcleo amigdalóide está localizado no lobo temporal e apresenta esse nome devido à disposição dos seus núcleos que formam uma estrutura semelhante a almôndegas. Essa estrutura é fundamental para que o organismo possa adquirir e expressar o medo condicionado, visto que lesões da amígdala interferem com os processos de aquisição da memória de medo contextual (Kida, 2019; Tovote, 2015; Phillips e Ledoux, 1992). A região pode ser subdividida em outros dois subnúcleos denominados de Amígdala Basolateral (BLA) ou Amígdala Central (CeA) que possuem características morfológicas e funcionais distintas. De forma geral, a BLA

codifica as informações externas adquiridas e é responsável por realizar as associações necessárias para parear sinais de alerta com o nível de perigo que emitem, enquanto que a CeA é a principal região de *output* (região de emissão de fibras eferentes para outras regiões do encéfalo), sendo responsável por enviar para outras regiões do cérebro o estímulo necessário para produzir as respostas efectoras comportamentais e autonômicas necessárias para produzir comportamentos defensivos que possam lidar com o estímulo ameaçador ao qual o organismo está sendo submetido (Harnnet, Goodman e Knight, 2020; Tovote, 2015)

Os processos de aprendizado associados com o complexo amígdalóide recebem controle e regulação de outras regiões do encéfalo. Uma dessas regiões é o hipocampo que está associado com a construção de memórias associadas ao contexto e posterior associação desse contexto com o estímulo incondicionado através da transmissão dessas informações para a amígdala (Tovote, 2015; Maren, 2001). No hipocampo são armazenadas as informações temporais, contextuais e as memórias relacionadas a fatos e eventos vivenciados pelo organismo (memórias declarativas) associadas ao estímulo aversivo e que podem ser consideradas ao longo do processo de evocação do comportamento defensivo em conjunto com os estímulos adquiridos pelo complexo amígdalóide. Desse modo, a aquisição e a expressão de uma memória contextual parecem depender como um todo da atividade hipocampal na medida em que essa região atua em conjunto com o complexo amígdalóide para formar a memória de medo (Harnnet, Goodman e Knight, 2020; Tovote, 2015). A projeção de fibras da BLA para o córtex entorrinal que, por sua vez, apresenta alto grau de *input* (recepção de fibras nervosas de outros núcleos do encéfalo) da formação hipocampal indica a participação dessa região na aquisição do medo condicionado ao contexto (Sparta et al, 2014; Tovote, 2015)

Outra região associada com a regulação da memória de medo condicionado é o CPFm que é responsável pelo processo de extinção, retenção da extinção da memória de medo e a evocação da memória, sendo de grande importância que a circuitaria estabelecida entre os

neurônios corticais e a amígdala estejam em harmonia a fim de que esses processos possam ser realizados de maneira eficaz (Tovote, 2015; Shin et al., 2006; Milad *et al*, 2007; Milad e Quirk, 2002). Em roedores a porção pré-límbica do córtex pré-frontal medial (PL) é responsável por evocar a memória de medo condicionado e regular a expressão, consolidação e aquisição da memória tanto contextual quanto ao som e isso pôde ser verificado por meio de estudos de lesão seletiva da área em ratos que produziu aumento da resposta do medo condicionado ao contexto e ao som tanto na fase de aquisição como na de extinção da memória (Giustino e Maren, 2015; Harnnet, Goodman e Knight, 2020; Izquierdo, Furini e Myskiw 2016; Maren, 2001; Tovote, 2015). Já a região Infralímbica do córtex pré-frontal medial (IL) está intimamente associada com a capacidade de evocação da memória de extinção, visto que lesão dessa região em ratos não prejudicou a capacidade do animal de aprender a memória de extinção, sendo, portanto, uma região crítica para o controle e supressão da resposta de medo condicionado (Giustino e Maren, 2015; Harnnet, Goodman e Knight, 2020; Izquierdo, Furini e Myskiw 2016; Maren, 2001; Tovote, 2015).

Alterações nessas regiões podem prejudicar a formação da memória de medo contribuindo para o desenvolvimento do TEPT. Nesse sentido, algumas evidências de alterações morfofuncionais foram encontradas em pacientes portadores do TEPT e que podem atuar como marcadores da doença, como hiperresponsividade da amígdala (Shin et al., 2006; Yehuda, 2002), da porção dorsal do córtex cingulado anterior (dACC) e do córtex insular (IC) (Pitman et al, 2012; Shin et al, 2009), enquanto que na formação hipocampal e no cortex pré-frontal ventromedial (vmCPF) verificou-se uma diminuição do volume de massa encefálica, além de diminuição da atividade neuronal desse último o que também está presente no córtex orbitofrontal (OFC) (Pitman *et al*, 2012; Shin et al, 2009; Yehuda, 2002). Todas essas regiões mencionadas estão intimamente relacionadas com o aprendizado da memória de medo, expressão dessa memória e associação a contextos, nocicepção e percepção sensorial além de

elicitarem em conjunto as respostas comportamentais e fisiológicas necessárias ao estímulo de medo aprendido (Giustino e Maren, 2015; Pitman *et al*, 2012; Shi et al, 2022; Shin et al., 2006; Shin et al, 2009; Tovote, 2015). Além disso, é bem documentada a presença de alterações no sistema neuroendócrino e no eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) (Yehuda *et al*, 1993; Pitman *et al*, 2012).

1.4 O Estresse como fator desencadeador do TEPT

O conceito de estresse como é conhecido hoje foi construído ao longo dos séculos por meio da contribuição de vários cientistas. Claude Bernard no século XIX expandiu a ideia do que seria uma condição harmônica do organismo estabelecendo a ideia de um estado dinâmico de equilíbrio fisiológico interno às células, o que ele chamou de *milieu interieur* (i.e. meio interno) (Holmes, 1986; Chrousos e Gold, 1992). Já no início do século XX, Walter Cannon pesquisando alterações simpatoadrenais frente a estados de desafio ao organismo cunhou o termo homeostase como uma tendência de um sistema biológico de tentar manter o seu *milieu interieur* constante, e estendeu esse conceito para estados emocionais e fisiológicos, além de descrever a resposta autonômico de luta-ou-fuga ao comprovar que estímulos variados impostos ao organismo podem desencadear uma resposta de aumento de secreção de catecolaminas preparando-o para uma ação vigorosa (Chrousos, 1992; Lu, Wei e Li, 2021; Szabo et al, 2017)

Um pouco mais tarde Hans Selye (1950) cunhou o termo “*stress*” (termo emprestado da física) pela primeira vez como uma forma de designar os procedimentos biológicos extremos aos quais submetia os animais no seu laboratório, sendo também de seu conhecimento a existência de possíveis eventos estressores com características psicológicas (Chrousos, 1992; Jackson, 2014). Segundo Selye (1936), qualquer agente nocivo físico, como frio extremo, imobilização forçada por horas, exercício físico repetitivo e exaustivo, procedimentos cirúrgicos, químico, doses subletais de drogas, ou psicológico quando aplicados aos ratos de laboratório eram capazes de elicitar uma resposta orgânica padrão que ocorria em três fases:

Uma fase de alarme inicial indicando a presença do estressor, a fase de resistência ao estresse e, por último, a fase de exaustão que poderia levar à morte como consequência. Ademais, suas pesquisas em laboratório também foram capazes de identificar mudanças morfológicas em órgãos específicos de ratos submetidos a diferentes condições de estresse. A chamada tríade clássica do estresse foi caracterizada por Selye a partir de uma análise anatomopatológica consistindo em hipertrofia da glândula adrenal, atrofia do sistema timo-linfático e ulceração gástrica (Jackson, 2014; Miller, 2018; Selye, 1936; Selye, 1988). Esse fenômeno foi descrito como uma resposta não-específica do organismo ao estressor ou *General adaptation syndrome* (GAS) em 1936, servindo como uma terminologia inicial para o que futuramente seria chamado de *stress* (Chrousos, 1992; Selye, 1936).

Os trabalhos subsequentes de Selye envolveram o refino do conhecimento científico e do entendimento dos esteróides, sua grande paixão, em condições patológicas e no organismo saudável (Jackson, 2014). Dessa forma, enquanto muitos pesquisadores da época, incluindo Canon, estudavam o impacto das substâncias produzidas pela medula adrenal, no caso noradrenalina e adrenalina, nas respostas ao estresse, Selye voltou suas pesquisas para o papel dos hormônios corticais produzidos pelo córtex da glândula adrenal. De fato, sua contribuição na área foi tão significativa que a ele é atribuída a autoria dos nomes dados aos hormônios esteroidais glicocorticóide e mineralocorticóide e a compreensão de que tais substâncias estavam envolvidas na manutenção da homeostase do organismo frente a circunstâncias estressoras, sendo responsáveis pela manutenção da vida e de estabelecer mecanismos de adaptação a mudanças externas e internas do organismo (Jackson, 2014; Miller, 2018; Selye, 1988). Para além da produção hormonal cortical, outros trabalhos foram desenvolvidos buscando entender como funcionava a regulação dessa glândula que para ele respondia a um estímulo “superior” o qual foi atribuído ao hipotálamo, esse, por estar conectado à glândula pituitária (ou adenohipófise) secretava uma substância que a estimulava a produzir ACTH

(hormônio adrenocorticotrópico) e secretar na corrente sanguínea, o que por sua vez regulava a produção de corticoesteróides da glândula adrenal. A estimulação dessa glândula pelo ACTH induzia o córtex adrenal a produzir substância que seriam as responsáveis pelas modificações dos órgãos verificadas na tríade clássica do estresse, diminuição da inflamação e aumento na produção de açúcar organismo (Jackson, 2014; Miller, 2018; Selye, 1988). Apesar da brilhante percepção fisiológica de Selye ele foi incapaz de estabelecer a relação entre Hipotálamo-Pituitária-Adrenal, o que atualmente é solidamente estabelecido na literatura como o eixo HPA intimamente associado às respostas ao estresse.

O eixo HPA é responsável por regular a resposta adaptativa de um organismo a um estímulo estressor. A liberação do hormônio regulador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo leva à estimulação da glândula pituitária, também denominada hipófise, na sua porção anterior promovendo a liberação de ACTH (Hormônio adrenocorticotrópico). Por sua vez, o ACTH induz a síntese e secreção de glicocorticoides na corrente sanguínea a partir do córtex adrenal (Joseph e Wirledghe, 2017). Os glicocorticóides atuam em uma série de vias de sinalização das quais pode-se citar o metabolismo da glicose, a regulação de vias de homeostase, do sistema cardiovascular e da resposta imune, com potente efeito anti-inflamatório (Joseph e Wirledghe, 2017; Oakley e Cidlowski, 2011; Overman *et al*, 2013). Estudos mostram que pacientes com TEPT tem níveis de CRH aumentados quando mensurados no líquido cefalorraquidiano e/ou no sangue (Dunn e Berridge, 1990). Em conjunto com esse achado, verificou-se também níveis anormais de cortisol nesses pacientes, contudo essa alteração é verificada por uma hipocortisolemia, ao invés de uma hipercortisolemia esperada devido ao fato de o TEPT ser bem caracterizado como um estresse crônico. Esses baixos níveis de cortisol ocorrem devido à sensibilização do eixo HPA e pelo feedback negativo endócrino exercido pelo cortisol sobre o início do eixo, inibindo a liberação de CRH e ACTH e permitindo

que os níveis fisiológicos desses hormônios retornem a estados mais basais (Pitmann *et al.*, 2012; Yehuda, 2002; Yehuda *et al.*, 2000; Yehuda *et al.*, 1990).

A desregulação de sistemas fisiológicos relacionados com a resposta ao estresse tendo como destaque disfunções do eixo HPA são condições patológicas bem descritas no TEPT e consideradas como fator desencadeador da psicopatologia, aliado a isso cada vez mais evidências vão surgindo sobre a relação de desregulação desse eixo em pacientes portadores da doença. Juntamente a estas condições, numerosos estudos comprovam a elevação de marcadores inflamatórios no sangue de pacientes com TEPT, dentre os quais pode-se citar as citocinas IL-1, IL-6 (Passos *et al.*, 2015) e o TNF- α (Bruenig *et al.*, 2017). De fato, é bem estabelecida a ideia geral de que o estresse mais intenso ou crônico pode causar inflamação através da ativação de receptores específicos para as moléculas produzidas devido ao estresse físico e psicológico (Fleshner *et al.*, 2017). Esse fenômeno ocorre por meio da liberação no núcleo paraventricular do hipotálamo de CRH, que além de estimular o eixo HPA via hipófise também estimula o sistema nervoso simpático ocasionando a liberação de catecolaminas. As catecolaminas, em especial a noradrenalina, podem estimular a produção de mediadores pró-inflamatórios como a IL-1 e IL-6 em diferentes tipos celulares, incluindo células do sistema nervoso central (Galic *et al.*, 2012; Bierhaus *et al.*, 2003). Uma das linhagens celulares relacionadas com processos inflamatórios no tecido cerebral é a micróglia. Em condições normais, esse tipo celular está em repouso e promove funções fisiológicas de manutenção do tecido, porém, em algumas doenças e determinadas condições essa célula pode tornar-se ativa e produzir respostas inflamatórias (Butovsky e Weiner, 2018). Mediadores pró-inflamatórios são secretados pela micróglia ativada podendo levar à ativação de astrócitos e um efeito cascata de aumento na produção de citocinas inflamatórias e de liberação de glutamato no tecido cerebral, aumentando a probabilidade de dano celular e promovendo a neuroinflamação (Takaki

et al., 2012). Condições inflamatórias são vistas em diversas patologias do SNC e podem ocasionar mudanças comportamentais funcionais e estruturais do cérebro.

Os eventos estressores também podem interferir no funcionamento, fisiologia e morfologia do cérebro como um todo. Sabe-se, portanto, que experiências vivenciadas em conjunto com estímulos emocionais intensos ou com eventos estressores são mais comumente lembradas de forma mais intensa e vívida do que outros tipos de situações do dia-a-dia (De Quervain et al, 2017; McGaugh, 2003). Por outro lado, o estresse é capaz de dificultar a evocação de memórias, principalmente as de longo prazo (Klier e Burato, 2020). Esse fenômeno é importante pois é um ponto chave no que diz respeito à fisiopatologia do TEPT e de outras desordens neuropsiquiátricas relacionadas ao estresse (De Quervain et al, 2017; Joels e Baram, 2009). Desse modo, os hormônios que são produzidos durante situações de estresse (glicocorticóides e mineralocorticóides) são capazes de modular as atividades cerebrais por meio da ligação à receptores do tipo GR (Receptores Glicocorticóides) e MR (Receptores Mineralocorticóides) que estão distribuídos de forma abundante pelo cérebro, com exceção dos receptores MR os quais são comumente encontrados nas zonas límbicas (De Quervain et al, 2017; Joels e Baram, 2009; Joels et al, 2006; McEwen, 2007; Roozendaal et al, 2009). Quando os glicocorticóides ligam-se em ambos os receptores são formados complexos transcricionais que são translocados para o núcleo celular a podem regular de forma positiva ou negativa uma série de genes, levando à transativação ou transrepressão dos genes-alvos. Essa ativação provoca a regulação do metabolismo, da resposta inflamatória, do desenvolvimento embrionário, de comportamentos relacionados ao estresse, da sensibilidade do eixo HPA e dos processos de formação da memória (Frank et al, 2021; Joels e Baram, 2009; Kadmiel e Cidlowski, 2013; McEwen, 2007; ter Heegde et al, 2015). Por conta da alta distribuição desses receptores no encéfalo, hormônios relacionados ao estresse são capazes de interferir diretamente com a fisiologia de regiões cerebrais tais como hipocampo, amígdala e córtex pré-

frontal, por exemplo, estruturas essas que estão intimamente associadas com os processos de formação da memória, além de estarem interconectadas por meio de projeções neurais diretas e indiretas (De Quervain et al, 2017; Joels e Baram, 2009; McEwen, 2007).

Com base no exposto, torna-se essencial que os estudos de TEPT que empregam modelos animais como ferramenta para auxiliar na compreensão dessa psicopatologia ou que busquem novas formas terapêuticas para o tratamento farmacoterapêutico possam simular as mesmas alterações vistas em pacientes portadores da desordem ou ao menos esteja o mais próximo possível de mimetizá-la com rigor científico. Nesse contexto, o paradigma do Estresse-Reestresse (SRS) vem sendo utilizado em inúmeros estudos de TEPT por apresentar algumas dessas alterações como ansiedade constante, hipocortisolemia, alterações no eixo HPA e aumento na sensibilidade de receptores de glicocorticóides (Yehuda e Antelman, 1993; Liberzon *et al.*, 1997; Kohda, *et al.*, 2007). O modelo consiste na exposição a um estresse prolongado com um lembrete do evento estressor, por meio da reexposição a um dos estressores, uma semana depois. A sequência corresponde a duas horas de estresse por restrição, seguido de nado forçado por vinte minutos e exposição ao éter até o animal ficar inconsciente. Sete dias após esses eventos o animal é reexposto a um dos estressores para eventual lembrete da situação traumática, simulando a constante lembrança da situação traumática por portadores de TEPT (Yehuda e Antelman, 1993).

1.5 O receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos (PPAR) como um alvo intracelular no tratamento das alterações encontradas no TEPT

Apesar dos diferentes mecanismos envolvidos na fisiopatologia do TEPT, a terapia farmacológica ainda é muito escassa e limitada. Até o momento, apenas dois fármacos pertencentes à classe dos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS), Sertralina e Paroxetina, possuem autorização da Food and Drugs Administration (FDA) para serem comercializados e utilizados como terapia farmacológica no tratamento de Transtorno de

Estresse Pós-Traumático (Hori e Kim, 2019). Entretanto, existe uma variação individual na resposta ao tratamento com ISRS (Hoskins *et al.*, 2015). Aliado a isso, estudos de meta análise indicam que a efetividade da terapia farmacológica é menor quando comparada aos efeitos oriundos da psicoterapia (Lee *et al.*, 2016), mas ainda assim maior que em indivíduos placebo (Gene-cos, 2005). Dessa forma, a busca por fármacos que possam melhorar os sintomas e consequentemente o quadro clínico de pacientes portadores de TEPT é de extrema necessidade, dito isso, fármacos com ação anti-inflamatória, que modulem a relação do eixo HPA ou até mesmo a dinâmica dos neurotransmissores podem significar avanços no tratamento.

Dentre as inúmeras vias e mecanismos bioquímicos que modulam a fisiologia celular, e consequentemente dos tecidos e órgãos, e que podem auxiliar regulando ou revertendo as alterações fisiopatológicas encontradas nos pacientes portadores do TEPT têm-se os receptores da classe PPAR (Receptores Ativados pelo Proliferador de Peroxissomos). A literatura científica vem a cada dia sendo incrementada por uma gama de estudos que apontam para o potencial farmacológico desses receptores no sentido de atuarem como alvos terapêuticos promissores em estudos com desordens neurodegenerativas (d'Angelo *et al.*, 2019; Mirza *et al.*, 2019), abrangendo a possibilidade desses efeitos benéficos, ainda de forma bem morosa, no tratamento de alguns distúrbios neuropsiquiátricos (d'Angelo *et al.*, 2019; Nisbet e Pinna, 2018). Os receptores PPAR pertencem à superfamília dos receptores nucleares hormonais, e estão envolvidos no controle da transcrição de genes específicos. Até o presente momento estão descritas três isoformas devidamente identificadas e que vêm sendo extensamente estudadas, PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ . Todas as isoformas, ao serem ativadas pelos seus ligantes endógenos naturais derivados de ácidos graxos como o ácido docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (PEA) ou por xenobióticos, regulam a expressão gênica ligando-se às regiões promotoras do DNA relacionadas com os seus respectivos genes alvos e denominadas elementos de resposta ao PPAR (PPREs). Quando ativados, os PPARs sofrem

heterodimerização com o receptor retinóide X (RXR) e então são translocados para o núcleo celular e ligam-se aos PPREs atuando como fatores de transcrição regulados por ligantes (Cai et al, 2018; d'Angelo et al, 2019; Locci e Pinna, 2019; Moreno et al, 2004; Nisbet e Pinna, 2018; Mirza et al, 2019; Warden et al, 2016).

Os receptores PPAR e suas isoformas apresentam função fisiológica crítica como sensores de lipídeos e na sua regulação metabólica pelo fato de serem ativados por ácidos graxos e eicosanóides. Além disso, esses receptores tem importante papel no metabolismo redox, na regulação do metabolismo da glicose, na diferenciação celular e na homeostase energética com algumas especificidades, mas também podem atuar inibindo a expressão de genes que codificam para substâncias pró-inflamatórias como o fator nuclear κ B (NF- κ B) e a proteína ativadora 1 (AP-1) (Mirza *et al.*, 2019; Towfighi e Oybiagele, 2008; Nisbet e Pinna, 2018; Monsalve *et al.*, 2013). A expressão desses receptores é bem variada podendo ser encontrados em células do sistema cardiovascular, do sistema imune, musculoesquelético e no sistema nervoso periférico e central (SNP e SNC), existindo uma presença majoritária em tecidos que atuam de forma intensa no metabolismo de ácidos graxos (fígado, coração e musculatura) (Mirza *et al.*, 2019; Nisbet e Pinna, 2018; Towfighi e Oybiagele, 2008). No sistema nervoso central de ratos há uma ampla distribuição de todas as isoformas dos receptores PPARs com algumas delas sendo restritas a algumas áreas específicas e que estão relacionadas com as emoções, memória, aprendizado e com a resposta ao estresse (Moreno et al, 2004). O receptor PPAR α está amplamente presente no SNC não sendo expressa apenas nos diferentes núcleos hipotalâmicos, em algumas células do cerebelo e na área tegmentar ventral (VTA). Do mesmo modo, o receptor PPAR γ está presente de forma bastante ampla, com exceção de regiões como p bulbo olfatório, algumas áreas do neocórtex e da VTA (Moreno et al, 2004). Ambos os receptores podem ser encontrados em regiões envolvidas com os processos emocionais, de memória, medo e ansiedade, aprendizado e formação de hábitos pelo fato das duas isoformas

dos PPARs estarem presentes em células de regiões encefálicas envolvidas nesses processos como o CPFm, amígdala e núcleo accumbens, além de serem altamente expressos na região da formação hipocampal (Moreno et al, 2004; Nisbet e Pinna, 2018; Warden et al, 2016).

As tiazolinedionas configuram uma classe de drogas que tem atividade hipoglicemiante e atualmente seu uso clínico restringe-se ao uso como hipoglicemiante oral para pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2. Dentre os fármacos representantes da classe pode-se citar a Rosiglitazona e a Pioglitazona (Betteridge, 2011; Davidson *et al.*, 2018) Por outro lado, derivados do ácido fíbrico (fibratos), como o Fenofibrato, são medicamentos de escolha no tratamento de hipertrigliceridemia e dislipidemia, em conjunto com as estatinas, em pacientes que não respondem ao tratamento não farmacológico (McKeage e Keating, 2011). Apesar das drogas terem seu uso clínico para diferentes comorbidades, elas compartilham um mesmo receptor celular para exercerem suas funções ao atuarem como ligantes sintéticos dos receptores ativados pelo proliferador de peroxissomos (PPAR).

O fenofibrato é um agonista de receptor PPAR α , sua ativação regula metabolismo mitocondrial, metabolismo de ácidos graxos e da glicose, estados redox e a neurotransmissão glutamatérgica e de outros neurotransmissores. O PPAR α também está associado com a expressão de subunidades específicas dos receptores NMDA e AMPA, e esses mecanismos aparentam ocorrer por meio da sinalização via proteína CREB (Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico) (Wójtowicz *et al.*, 2020; Roy *et al.*, 2013). Com relação a neurotransmissão do glutamato, há relatos de que o uso de agonista de receptor PPAR α pode alterar enzimas reguladoras do metabolismo de antagonistas endógenos do receptor de glutamato (via da Kinurenina) (Zakrocka *et al.*, 2018) e promover a endocitose de transportadores de glutamato (GLT-1) em astrócitos (Huang *et al.*, 2017). Ademais, é notório o papel desses receptores na regulação da inflamação. Estudos com cultura celular de fibroblastos sinoviais mostraram que ocorreu uma diminuição de IL-1 β , IL-6 e do TNF- α

induzidos por LPS quando administrado ao meio agonista do PPAR α (Huang *et al.*, 2016). O mesmo efeito pôde ser observado *in vivo* com ratos quando submetidos a um modelo de dano pulmonar agudo mediado por LPS (Yoo *et al.*, 2013). Por fim, a ativação de receptores PPAR α em um modelo de TEPT realizado em ratos foi eficaz em reduzir a aquisição da memória de medo e facilitar a extinção da mesma memória (Locci *et al.*, 2017)

No que diz respeito aos receptores PPAR γ têm-se como representantes de agonistas a classe de fármacos das Tiazolinedionas, como já citado. Esses receptores quando ativados realizam a regulação de genes e seu efeito é traduzido em adipogênese, metabolismo lipídico, diminuição da inflamação e regulação do balanço energético (Davidson *et al.*, 2018). Apesar de haverem poucos estudos sobre a relação do receptor PPAR- γ com a regulação de glutamato, muitas evidências apontam para uma melhora causada pelo uso das Tiazolinedionas, no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas que envolvem neuroinflamação e excitotoxicidade (Davidson *et al.*, 2018; Chiang *et al.*, 2015), principalmente na Doença de Alzheimer (Pedersen *et al.*, 2006). Alguns estudos apontam para uma neuroproteção mediada pelo PPAR- γ , onde dano neuronal causado em modelo *in vivo* teve seu efeito excitotóxico mediado por NMDA revertido com agonista do PPAR- γ (Zhao *et al.*, 2006) ou por seu coativador PGC-1 α (Puddifoot *et al.*, 2012) Quando esses receptores encontram-se regulados negativamente é possível observar uma exacerbação da ansiedade basal, da sensibilidade ao estresse e produz atividade diferenciada na amígdala e no hipocampo em situações de estresse induzido (Nisbett e Pinna, 2018; Domi *et al.*, 2016). Em modelo para o estudo do envelhecimento, animais tratados com Rosiglitazona reverteram o déficit na porcentagem de freezing avaliado no medo condicionado ao contexto quando comparado com ratos envelhecidos controle. Além dessas atividades induzidas pela ativação do receptor, também foi verificado que o agonismo de PPAR γ foi eficaz em reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) via sinalização dependente de mTOR (Zhao *et al.*, 2020),

e o aumento na expressão desse receptor é capaz de diminuir também a presença de receptores do tipo toll-like (TLR4) (Shirvani *et al.*, 2021).

Dessa forma, as isoformas alfa e gama dos receptores PPAR aparentam ter forte ligação com a formação de memórias aversivas, principalmente ao constatar a expressão desses receptores em regiões do SNC que estão atreladas aos processos mnemônicos no processamento dessas memórias associadas com respostas emocionais e por regularem uma série de genes importantes para a neuroplasticidade celular e fisiologia neural. Sendo assim, a hipótese levantada neste estudo foi de que a ativação dos receptores PPAR α ou PPAR γ podem melhorar o processo de extinção da memória de medo condicionado ao contexto de animais que apresentam déficit na consolidação da etapa de extinção de memória aversiva causado pelo estresse.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Verificar os efeitos da administração de Pioglitazona e Fenofibrato na extinção do medo condicionado ao contexto de ratos Wistar submetidos ao modelo de TEPT

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar o modelo de Estresse Reestresse (SRS) em ratos Wistar
- Avaliar a retenção da memória de extinção em ratos Wistar quando doses sub-crônicas de Pioglitazona são administradas por via intraperitoneal em um modelo de TEPT
- Avaliar a retenção da memória de extinção em ratos Wistar quando doses subcrônicas de Fenofibrato são administradas por via intraperitoneal em um modelo de TEPT
- Avaliar a retenção da memória de extinção em ratos Wistar quando doses de GW9664 e GW 6542 são administradas por via intraperitoneal em um modelo de TEPT
- Avaliar a retenção da memória de extinção em ratos Wistar quando doses agudas de Pioglitazona são administradas por via intraperitoneal em um modelo de TEPT

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Ao longo de todos os experimentos foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar em idade adulta, com 9 semanas de idade, pesando entre 280-320 gramas e obtidos da empresa ANILAB - Animais de Laboratório Criação e Comercialização Ltda. (São Paulo, Brasil). Os animais ficaram acondicionados em caixas específicas de acrílico (dimensões) armazenadas em racks ventiladas em condições padrão de temperatura, entre 22 e 24°C, ciclo claro e escuro de 12h (06:00a.m. – 18:00p.m.) com água e comida *Ad libitum*. As caixas com os animais foram armazenadas na sala de biotério do Laboratório de Neurofarmacologia do departamento de Farmacologia, nas dependências do prédio da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Todos os protocolos experimentais passaram pela apreciação e consequente aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FMRP) e estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), número processo:17/2021 **(ANEXO I)**.

3.2 Drogas

As drogas utilizadas durante todos os procedimentos farmacológicos foram as seguintes: Fenofibrato (agonista dos receptores PPAR α ; 0,1, 1, 10 mg/kg) diluído em DMSO 10% e Tween 2%, bem como Pioglitazona (agonista dos receptores PPAR γ ; 0,1, 1, 10 mg/kg) em DMSO 1% e Tween 2%, GW 6471(2 mg/kg) (Gaspar et al., 2020; antagonista PPAR α) diluído em DMSO 10% e Tween 2% e GW9662 (2 mg/kg) (Gaspar *et al.*, 2020; antagonista PPAR γ) em DMSO 1% e Tween 2%. Também foi utilizado Uretana (1,25 mg/kg). Todas as substâncias acima foram compradas da empresa *Tocris*® e administradas via intraperitoneal (i.p.).

3.3 Protocolo de Estresse Repetido (ou Estresse-Reestrese)

Os animais serão submetidos ao protocolo de estresse reestresse (SRS) solidamente estipulado em literatura como um modelo de TEPT (Harvey *et al*, 2006; Liberzon *et al.*, 1997) capaz de causar alterações no eixo HPA semelhantes àquelas encontradas em portadores do transtorno. O modelo consiste em restringir os animais em um cilindro de metal (6 cm diâmetro x 15cm comprimento) por 2h, seguido de teste do nado forçado por 20 minutos e, por fim, o animal será colocado em uma caixa (30 cm x 19 cm x 12,5 cm) hermeticamente fechada com um chumaço de algodão embebido em éter por um período de tempo variável até que o animal atinja a inconsciência, mensurada pela ausência de resposta nociceptiva após aplicação de pressão na pata posterior com o auxílio de pinça. Após isso, o animal será imediatamente retirado e alocado na sua caixa de origem, onde não passará por nenhum distúrbio ou estresse por um intervalo de 7 dias. Passado esse intervalo de repouso, os animais serão submetidos novamente a um dos eventos estressores previamente apresentados para atuar como um lembrete do evento traumático, sendo feito por meio da reexposição ao nado forçado por 20 minutos (Reestresse) (Figura 1).

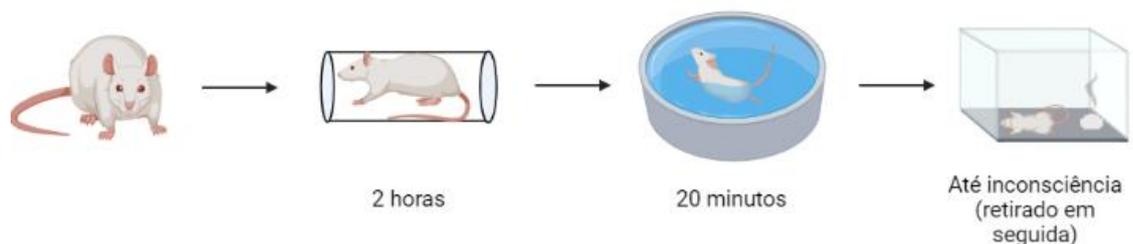


Figura 1. Sequência de estímulos estressores aplicados no modelo de Estresse Reestresse (SRS).

3.4 Análise Comportamental

3.4.1 Paradigma do Medo Condicionado ao Contexto

A execução do paradigma comportamental será feita utilizando-se uma caixa de 23x20x26cm (largura x profundidade x altura) formada por 3 paredes de alumínio com a parte frontal de acrílico, cujo assoalho é constituído por barras metálicas (23x20x2cm cada) que conduzem corrente elétrica (*Insight instrumens*, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O protocolo experimental consistiu em quatro sessões com intervalos entre cada uma (Figura 2). A habituação foi a primeira sessão do MCC, onde os animais foram gentilmente colocados na caixa por 10 minutos sem receber nenhum tipo de estímulo aversivo. Posteriormente, ocorreu o condicionamento (ou treino), onde os animais foram expostos, de forma individual, à caixa de condicionamento por um período de 300 segundos a fim de habituarem-se novamente ao ambiente. Após esse tempo, 3 choques nas patas de 0,65 mA com duração de 1s em intervalos pseudorrandômicos (30, 60 e 40 segundos) foram elicitados com o auxílio de um gerador de choque conectado à caixa, seguido da permanência do animal na caixa por um período de 180 segundos sem nenhum estímulo elétrico antes de retorná-lo para a sua caixa. Na terceira sessão do MCC, foi realizada a sessão de extinção na qual os animais, individualmente, foram expostos à mesma caixa, onde haviam sido previamente condicionados, por 30 minutos sem a apresentação de qualquer estímulo elétrico. Na quarta e última sessão do MCC avaliou-se a retenção da memória de extinção, que consistiu na exposição individual dos animais à mesma caixa utilizada nas duas sessões anteriores por um período de 5 minutos (Uliana *et al* 2010, Rosa *et al*, 2014). O parâmetro comportamental (medida de memória) observado ao longo de todo o protocolo foi o tempo em que o animal permaneceu em estado de *freezing*, caracterizado pela imobilidade total com exceção apenas dos movimentos respiratórios. A sessão teste foi realizada em uma sala de experimentação diferente da utilizada para o procedimento de condicionamento e extinção. Todas as vezes, antes e após o uso do aparato experimental, será

feita a limpeza do material com auxílio de papel toalha e álcool 70%, visando a retirada de qualquer pista olfativa que permaneça para o outro animal que for exposto à caixa (Lisboa et al., 2010).

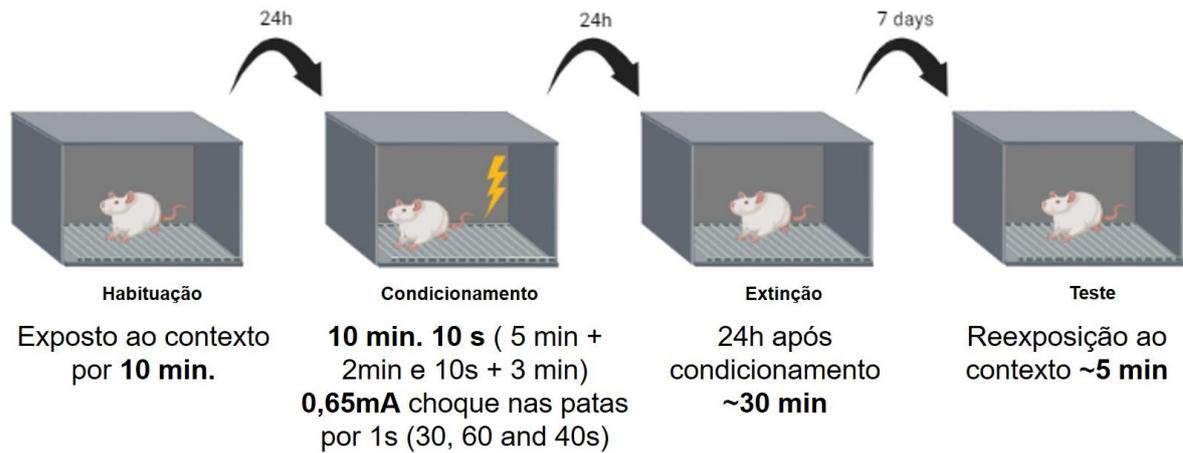


Figura 2. Representação esquemática das quatro sessões do protocolo de medo condicionado ao contexto empregados neste estudo, consistindo de habituação, condicionamento, extinção e teste de retenção.

3.4.2 Teste do campo aberto

Neste paradigma comportamental, os ratos foram introduzidos a uma caixa de campo aberto (100 cm x 100 cm x 40 cm) como definido por Belzung (1999) para análise da capacidade locomotora e explorativa. O grau de locomoção foi medido pela distância percorrida. Além disso, avaliou-se o tempo dispendido no quadrante central do aparato, visto que, neste modelo, roedores tendem a apresentar comportamento normal do tipo tigmotático (preferência por permanecer em contato com as paredes) evitando a região central. Dessa forma, aumento do tempo em que o animal permanece na porção central assim como diminuição na latência para entrada na mesma região indicam que o animal não apresenta comportamento tipo ansioso (Prut e Belzung, 2003). O aparato foi filmado com uma câmera localizada na região superior ao equipamento e as análises feitas no software ANY-maze ver. 7.20 de imagem para campo aberto.

3.5 Protocolos Experimentais

Protocolo 1. Padronização do modelo de Estresse-Reestresse

Com o intuito de verificar se diferentes intensidades de choques interferem nos parâmetros comportamentais observados no MCC, os animais foram aleatoriamente separados nos seguintes grupos experimentais:

- 1) Controle 0,45mA
- 2) SRS 0,45mA
- 3) Controle 0,65mA
- 4) SRS 0,65mA

Os animais foram estressados da mesma forma supracitada e condicionados no dia seguinte ao último dia de estresse utilizando-se parâmetros de choque diferentes do experimento anterior (3 choques de 0,65 mA com duração de 1s em intervalos pseudorrandômicos 30, 60 e 40 segundos ou 3 choques de 0,45 mA com duração de 1s em intervalos pseudorrandômicos de 30, 60 e 40 segundos) a depender do grupo experimental em questão. No dia posterior, os animais foram submetidos ao processo de extinção da memória do condicionamento e, diferentemente do protocolo anterior, 7 dias depois foram submetidos a uma única sessão de teste de extinção com 5 minutos de duração (Figura 3).

Por último foi realizado um experimento para verificar se o condicionamento dos animais em colônia ou de forma isolada seria capaz de alterar os parâmetros de memória observados nos experimentos prévios de medo condicionado ao contexto. Dessa forma, os grupos experimentais foram os seguintes:

- 1) Controle
- 2) SRS Homepage
- 3) SRS isolado

Os animais foram estressados e em seguida condicionados no dia seguinte ao último dia de estresse utilizando-se parâmetros de deflagração de choque com base no resultado do experimento anterior (3 choques de 0,65 mA com duração de 1s em intervalos pseudorrandômicos de 30, 60 e 40 segundos). Da mesma forma que nos experimentos anteriores, os animais foram submetidos ao processo de extinção da memória do condicionamento e 7 dias depois à sessão de teste de extinção com 5 minutos de duração (Figura 3).

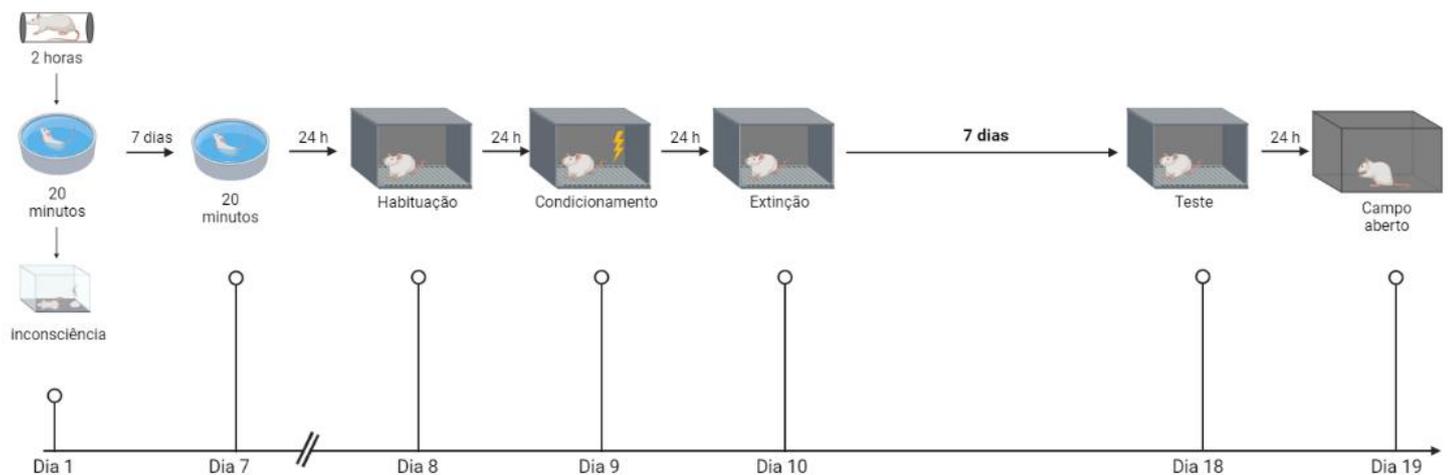


Figura 3. Esquema do protocolo de SRS e MCC empregado no presente estudo e utilizado nos experimentos de padronização do modelo. (Imagem criada por meio do aplicativo Biorender®)

Protocolo 2. Efeito da administração sistêmica de agonista PPAR γ na resposta de medo condicionado ao contexto de animais submetidos ao modelo de SRS

Os animais foram submetidos à sequência de estímulos estressores na ordem em que foram anteriormente citados e 24h depois foram colocados na caixa de condicionamento ao

contexto para habituação. No segundo dia retornaram para a caixa a fim de serem condicionados ao contexto (3 choques de 0,65 mA com duração de 1s em intervalos pseudorrandômicos de 30, 60 e 40 segundos), enquanto que no terceiro dia foram reexpostos a mesma caixa para extinção da memória de medo consolidada. Um dia após a extinção os animais receberam administração de Pioglitazona (agonista do receptor PPAR γ) por via intraperitoneal e em diferentes doses todos os dias até completar 7 dias de administração do fármaco. Dessa forma, os grupos experimentais foram definidos da seguinte forma:

- 1) Animais controle + Veículo (DMSO + Tween 80)
- 2) Animais estressados + Veículo (DMSO + Tween 80)
- 3) Animais estressados + Pioglitazona 0,1 mg/kg
- 4) Animais estressados + Pioglitazona 1 mg/kg
- 5) Animais estressados + Pioglitazona 10 mg/kg

No último dia de administração os animais retornaram para a caixa de condicionamento para testar a retenção da memória de extinção passados 30 minutos da última injeção e foram avaliados quanto ao comportamento de *freezing*. No dia seguinte os animais não receberam nenhum tipo de fármaco e foram avaliados quanto à atividade locomotora no teste do campo aberto e em seguida sacrificados (Figura 4).

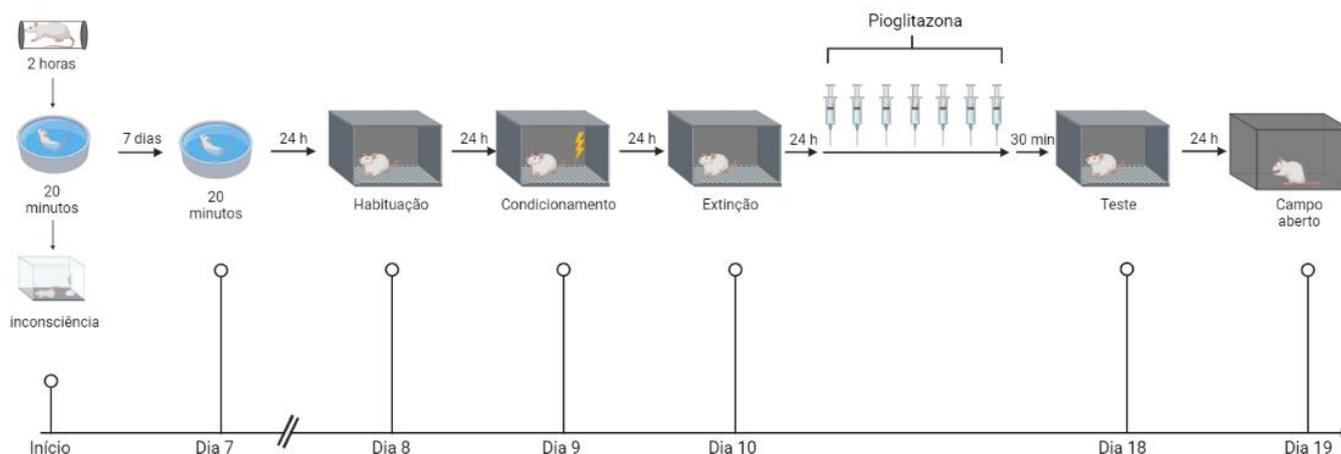


Figura 4. Esquema do protocolo de SRS e MCC empregado no presente estudo demonstrando o momento e frequência da aplicação do agonista PPAR γ . (Imagem criada por meio do aplicativo Biorender®)

Protocolo 3. Efeito da administração aguda de agonista PPAR γ na resposta de medo condicionado ao contexto de animais submetidos ao modelo de SRS

Os animais foram submetidos à sequência de estímulos estressores na ordem em que foram anteriormente citados e 24h depois foram colocados na caixa de condicionamento ao contexto para habituação. No segundo dia retornaram para a caixa a fim de serem condicionados ao contexto (3 choques de 0,65 mA com duração de 1s em intervalos pseudorrandômicos de 30, 60 e 40 segundos), enquanto que no terceiro dia foram reexpostos a mesma caixa para extinção da memória de medo consolidada. No dia posterior à extinção os animais receberam a administração de Pioglitazona (agonista do receptor PPAR γ) na dose de 10mg/kg ou veículo (DMSO + Tween 80) por via intraperitoneal nos demais momentos do tratamento. Os animais pertencentes ao grupo que recebeu a dose de Pioglitazona foram divididos em dois grupos. O primeiro recebeu Pioglitazona no primeiro dia de tratamento e veículo nos demais, enquanto que no segundo a administração de veículo ocorreu desde o primeiro dia até o penúltimo dia de

tratamento, pois, no último dia foi feita uma única administração de Pioglitazona. Dessa forma, os grupos experimentais foram definidos da seguinte forma:

- 1) Animais controle + Veículo (DMSO + Tween 80)
- 2) Animais estressados + Veículo (DMSO + Tween 80)
- 3) Animais estressados + Pioglitazona 10 mg/kg (dia 1)
- 4) Animais estressados + Pioglitazona 10 mg/kg (dia 7)

No último dia do tratamento farmacológico os animais retornaram para a caixa de condicionamento para testar a retenção da memória de extinção passados 30 minutos da última injeção do fármaco e foram avaliados quanto ao comportamento de *freezing* (Figura 5).

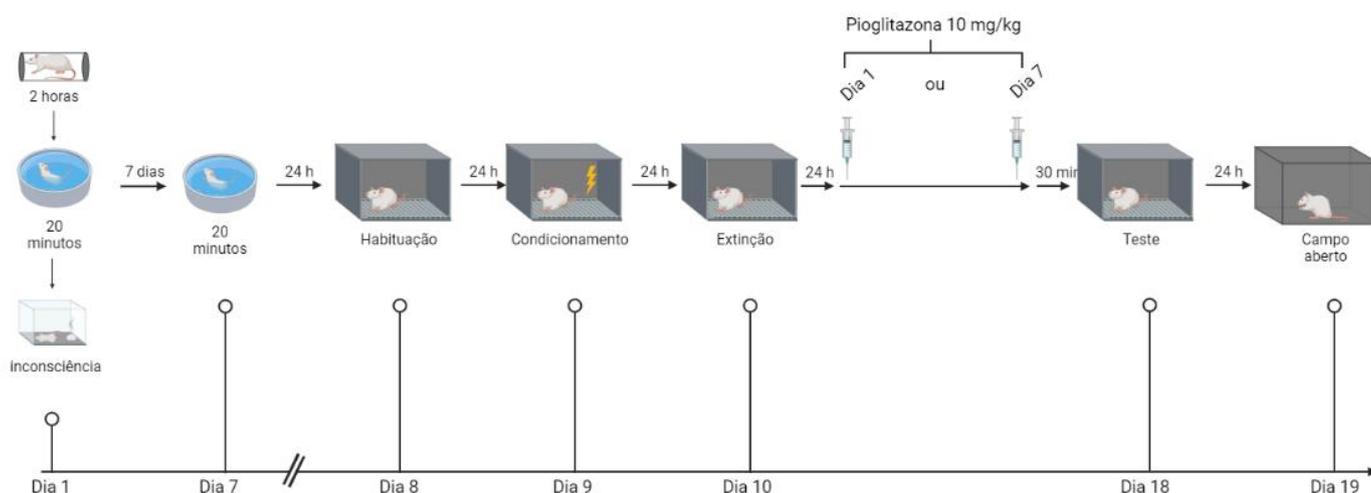


Figura 5. Esquema do protocolo de SRS e MCC empregado no presente estudo demonstrando o momento e aplicação aguda do agonista PPAR γ . (Imagem criada por meio do aplicativo Biorender®)

Protocolo 5. Efeito da administração sistêmica de agonista PPAR α na resposta de medo condicionado ao contexto de animais submetidos ao modelo de SRS

Os animais foram submetidos à sequência de estímulos estressores na ordem em que foram anteriormente citados e 24h depois foram colocados na caixa de condicionamento ao

contexto para habituação. No segundo dia retornaram para a caixa a fim de serem condicionados ao contexto (3 choques de 0,65 mA com duração de 1s em intervalos pseudorrandômicos de 30, 60 e 40 segundos), enquanto que no terceiro dia foram reexpostos a mesma caixa para extinção da memória de medo consolidada. Um dia após a extinção os animais receberam administração de Fenofibrato (agonista do receptor PPAR α) por via intraperitoneal e em diferentes doses todos os dias até completar 7 dias de administração do fármaco. Dessa forma, os grupos experimentais foram definidos da seguinte forma:

- 1) Animais controle + Veículo (DMSO + Tween 80)
- 2) Animais estressados + Veículo (DMSO + Tween 80)
- 3) Animais estressados + Fenofibrato 0,1 mg/kg
- 4) Animais estressados + Fenofibrato 1 mg/kg
- 5) Animais estressados + Fenofibrato 10 mg/kg

No último dia de administração os animais retornaram para a caixa de condicionamento para testar a retenção da memória de extinção passados 30 minutos da última injeção e foram avaliados quanto ao comportamento de *freezing*. No dia seguinte os animais não receberam nenhum tipo de fármaco e foram avaliados quanto à atividade locomotora no teste do campo aberto e em seguida sacrificados (Figura 6).

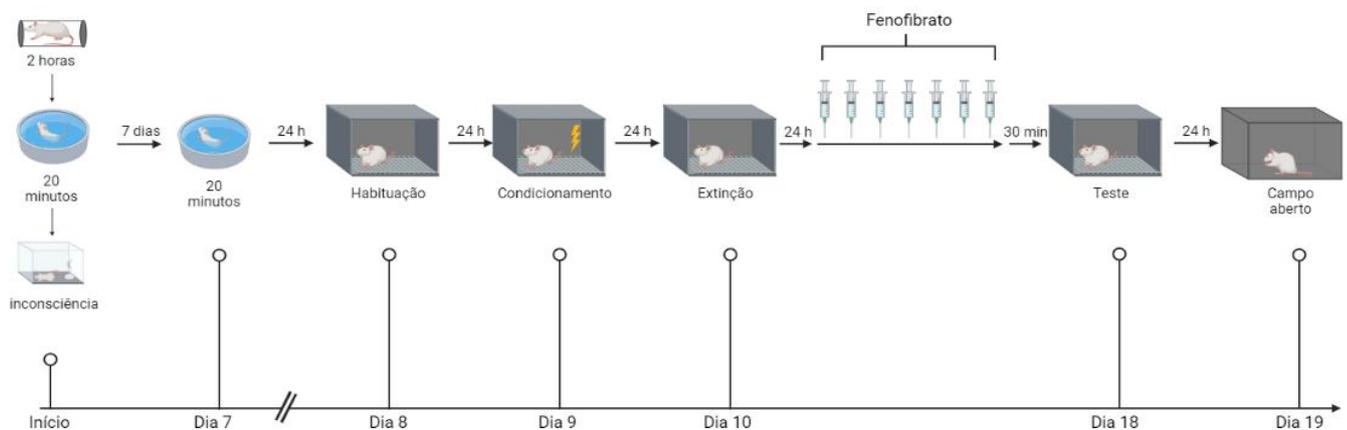


Figura 6. Esquema do protocolo de SRS e MCC empregado no presente estudo demonstrando o momento e frequência da aplicação do agonista PPAR α . (Imagem criada por meio do aplicativo Biorender®)

Protocolo 6. Efeito da administração sistêmica de antagonistas PPAR γ e PPAR α na resposta de medo condicionado ao contexto de animais submetidos ao modelo de SRS

Os animais foram submetidos à sequência de estímulos estressores na ordem em que foram anteriormente citados e 24h depois foram colocados na caixa de condicionamento ao contexto para habituação. No segundo dia retornaram para a caixa a fim de serem condicionados ao contexto (3 choques de 0,65 mA com duração de 1s em intervalos pseudorrandômicos de 30, 60 e 40 segundos), enquanto que no terceiro dia foram reexpostos a mesma caixa para extinção da memória de medo consolidada. Um dia após a extinção os animais receberam administração de GW9665 (antagonista do receptor PPAR γ) e GW6471 (antagonista do receptor PPAR α) por via intraperitoneal nas doses de 2 mg/kg todos os dias até completar 7 dias de administração do fármaco. Dessa forma, os grupos experimentais foram definidos da seguinte forma:

- 1) Animais controle + Veículo (DMSO + Tween 80)
- 2) Animais estressados + Veículo (DMSO + Tween 80)

3) Animais estressados + GW9665 2 mg/kg

4) Animais estressados + GW6471 2 mg/kg

No último dia de administração os animais retornaram para a caixa de condicionamento para testar a retenção da memória de extinção passados 30 minutos da última injeção e foram avaliados quanto ao comportamento de *freezing*. No dia seguinte os animais não receberam nenhum tipo de fármaco e foram avaliados quanto à atividade locomotora no teste do campo aberto e em seguida sacrificados (Figura 7).

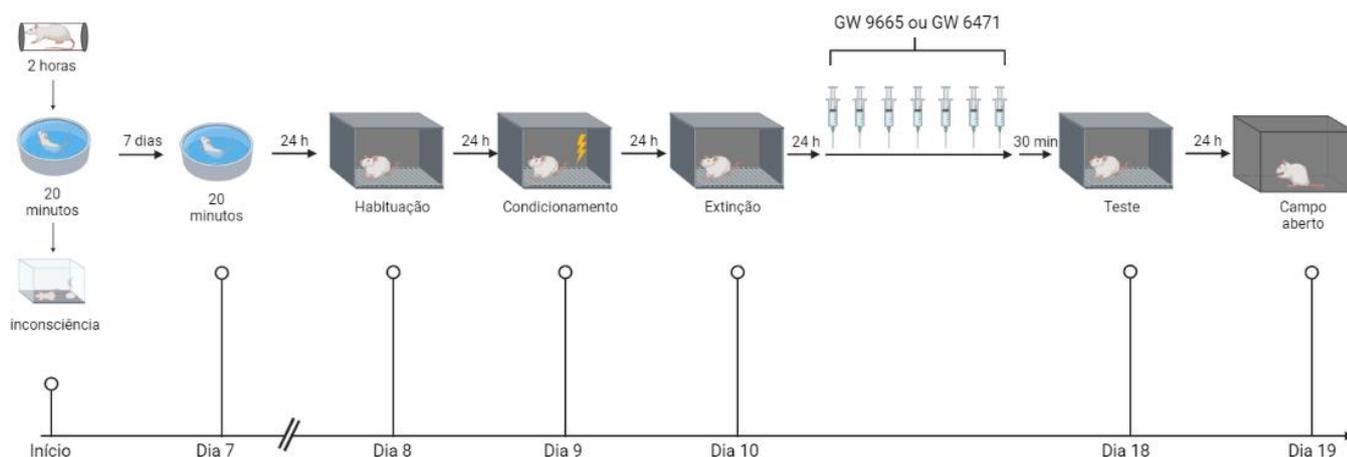


Figura 7. Esquema do protocolo de SRS e MCC empregado no presente estudo demonstrando o momento e frequência da aplicação dos antagonistas PPAR α e PPAR γ . (Imagem criada por meio do aplicativo Biorender®)

3.6 Análises Estatísticas

Os dados obtidos em todos os experimentos relacionados ao medo condicionado ao contexto foram tabelados na medida de tempo de *freezing* em segundos, em seguida foi feita a porcentagem desse tempo para cada minuto observado (% *freezing*) expressos nos gráficos deste trabalho. Quanto aos parâmetros do campo aberto foram analisados os valores de distância

(m), tempo de imobilidade (segundos), número de entradas no centro do aparato, tempo dispendido no centro (segundos), número de entradas na periferia e tempo dispendido na periferia (segundos).

A partir do momento que os valores foram tabelados iniciou-se a análise dos mesmos quanto ao seu significado estatístico por meio da análise de variância (ANOVA) do tipo *one-way* ou *two-ways*, seguida do teste *post-hoc* de *Tukey* ou de *Dunnet*. Para análises comparativas de uma variável entre apenas dois grupos foi utilizado o teste t-student. O grau de significância utilizado para os dados levou em conta o valor bicaudal de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Padronização do modelo de Estresse-Reestresse

No primeiro experimento de padronização os animais foram estressados e em seguida condicionados em diferentes intensidades de choques (Controle 0,45mA, n = 5; SRS 0,45mA, n = 5, ou Controle 0,65mA, n = 6, e SRS 0,65mA, n = 6) para verificar se a diferença de intensidades seria um fator determinante para a formação da memória de medo ao contexto em animais estressados e não estressados (Figura 8). Inicialmente, observou-se que os animais expressaram um aumento gradual e significativo na porcentagem de *freezing* ao final dos 10 minutos em que foram avaliados quando comparado com os minutos iniciais ao longo do tempo (n = *two-way* ANOVA, $F_{3,065, 55,17} = 73,39$; $p < 0,0001$) na sessão de condicionamento (Tabela 1). Além disso, na mesma sessão não houve interação entre os fatores observados (*two-way* ANOVA, $F_{27, 162} = 0,8790$; $p = 0,6406$) nem da condição de estresse (*two-way* ANOVA, $F_{3, 18} = 0,1373$; $p = 0,9365$), indicando que o condicionamento ocorreu de forma igual entre os grupos experimentais (Figura 8).

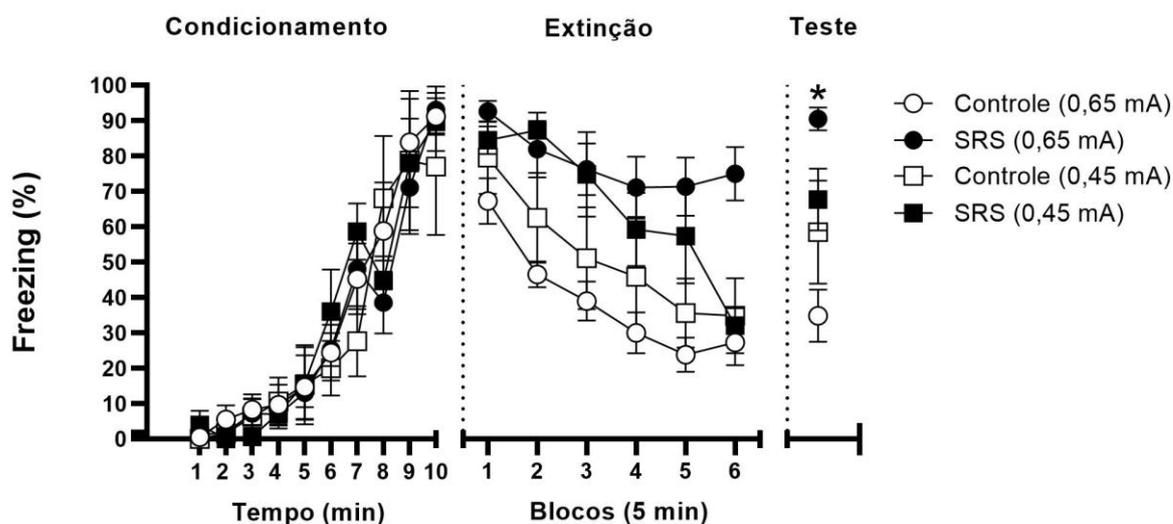


Figura 8. Perfil temporal de condicionamento, extinção e teste de retenção da memória de medo condicionado ao contexto em ratos submetidos a diferentes protocolos de intensidade de choque demonstrando que os animais estressados e condicionados na intensidade de 0,65mA apresentam prejuízo na capacidade de extinção da memória de medo condicionado ao contexto. Os animais foram divididos entre os grupos experimentais Controle 0,45 mA (n= 5), estressados 0,45 mA (n=5), Controle 0,65 mA (n= 6) e estressados 0,65 mA (n=5). Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) pelo tempo total de 10min, 30min. e 5min. para o condicionamento, extinção e teste, respectivamente. * *Posthoc* de Tukey indica valor de $p = 0,0010$ quando comparado com animais controle 0,65mA.

Tabela 1. Resultado da análise *posthoc* de Tukey comparando o primeiro e os dois últimos minutos da sessão de condicionamento ao contexto de grupos controle e estressados submetidos a diferentes intensidades de condicionamento.

Grupo	1º minuto vs. 9º minuto	1º minuto vs. 10º minuto
Controle 0,65	P=0,0161	P= 0,0003
SRS 0,65	P= 0,0455	P= 0,0005
Controle 0,45	ns*	ns*
SRS 0,45	P=0,0317	P=0,0049

* Valor de $p > 0,05$

Durante a sessão de extinção da memória de medo condicionado ao contexto os animais apresentaram uma resposta de freezing que variou ao longo do tempo (*two-way* ANOVA, $F_{3,90} = 55,67$; $p < 0,0001$), sofreu influência do fator estresse (*two-way* ANOVA, $F_{3,18} = 6,192$; $p = 0,0044$) e também apontou para uma interação entre o estresse e a intensidade de choque nas patas (*two-way* ANOVA, $F_{15,90} = 2,052$; $p = 0,0197$) (Figura 8). Durante os primeiros 5 min. da sessão (expressão do medo condicionado) não houve diferença estatística entre os grupos controle e estressados, apesar de haver uma tendência estatística (*one-way* ANOVA, $F_{3,18} = 3,079$; $p = 0,0538$) (Figura 9). Contudo, foi observada diferença significativa na resposta de *freezing* entre os animais controle 0,65mA versus estressados 0,65mA (*posthoc* de Tukey, $p = 0,0371$). Em relação aos últimos 5 min. (Figura 10-A) verificou-se que animais estressados e condicionados na intensidade de 0,65mA apresentam porcentagem de freezing elevada indicando um prejuízo na aquisição da memória de extinção quando comparado com seu respectivo controle (0,65mA) (*one-way* ANOVA, $F_{3,18} = 8,945$; $p = 0,0008$; *posthoc* de Tukey, $p = 0,0011$), e com os demais grupos controle e estressados (SRS 0,65mA versus. SRS 0,45mA, $p = 0,0045$; SRS 0,65mA versus. Controle 0,45mA, $p = 0,0079$). Apesar disso, ao comparar os valores de *freezing* no momento da expressão com os últimos 5 min. da extinção nota-se que houve uma diminuição da porcentagem dessa resposta em todos os grupos experimentais (Controle 0,65mA, Teste t pareado, $t = 4,189$, $df = 5$, $p = 0,0086$; SRS 0,65mA, Teste t pareado, $t = 2,838$, $df = 5$, $p = 0,0363$; Controle 0,45mA, Teste t pareado, $t = 4,387$, $df = 4$, $p = 0,0118$; SRS 0,45mA, Teste t pareado, $t = 8,083$, $df = 4$, $p = 0,0013$), mesmo que tenham ocorrido em valores mais pronunciados ou não. Sendo assim, durante a extinção os valores iniciais de *freezing* diferem dos minutos finais em todos os grupos, porém nos grupos controle 0,65mA, controle 0,45mA e SRS 0,45mA essa diferença é bem maior do que nos animais SRS 0,65mA.

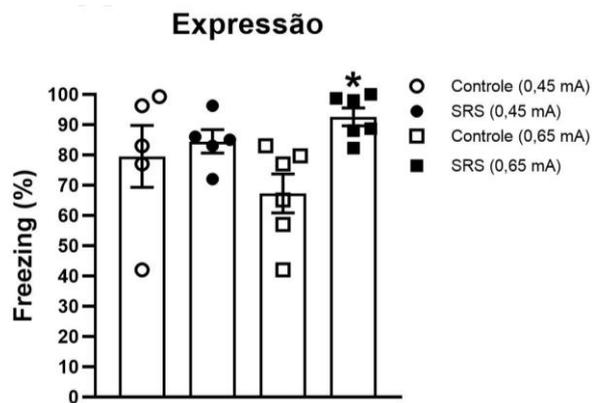


Figura 9. Expressão do medo condicionado ao contexto (5min. iniciais da sessão de extinção) em animais estressados e não estressados submetidos a diferentes protocolos de intensidade de choque nas patas. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm erro Padrão da Média (EPM) avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com controle 0,65mA.

Decorridos sete dias da sessão de extinção os animais foram novamente reexpostos à caixa de condicionamento para avaliar a capacidade de retenção da memória de extinção. Os animais estressados e condicionados em 0,65mA demonstraram comportamento de *freezing* expresso em nível porcentual aumentado, como verificado na Figura 10-B (*two-way* ANOVA, $F_{3, 18} = 7,413$, $p = 0,0020$). Além disso, esses valores também diferem de forma significativa dos animais controle 0,65 (*posthoc* de Tukey, $p = 0,0010$), indicando que o estresse prévio ao condicionamento na intensidade de choque nas patas de 0,65 é capaz de induzir um prejuízo na retenção da memória de extinção, visto que os animais controle foram capazes de extinguir a memória de medo condicionada ao contexto. Ao comparar o percentual de *freezing* do dia do teste com os últimos cinco minutos da sessão de extinção foi possível verificar que apenas o grupo controle 0,65 não teve alteração significativa no valor (Teste t pareado, $t = 1,452$, $df = 5$, $p = 0,2061$), enquanto que os demais grupos todos tiveram um aumento na porcentagem de *freezing* (SRS 0,65, Teste t pareado, $t = 3,159$, $df = 5$, $p = 0,0251$; Controle 0,45, $t = 3,367$, $df = 4$, $p = 0,0281$; SRS 0,45, $t = 6,991$, $df = 4$, $p = 0,0022$) (Figura 10 A comparada com B).

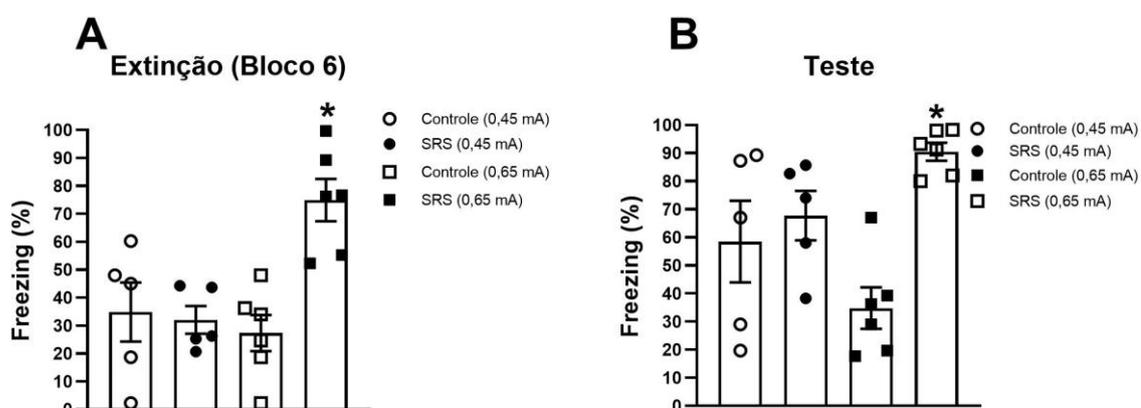


Figura 10. Últimos 5min. da sessão de extinção do medo condicionado ao contexto de animais estressados e não estressados submetidos a diferentes protocolos de intensidade de choque nas patas **(A)** e sessão de teste de retenção da memória de extinção **(B)** Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com todos os outros grupos experimentais **(A)** ou apenas com o grupo controle 0,65mA **(B)**. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com controle 0,65mA.

No teste do campo aberto não houve interação entre a intensidade de choque nas patas e o fator estresse em nenhum dos parâmetros analisados (*two-way* ANOVA, distância percorrida, $F_{1, 17} = 0,0005924$, $p = 0,9809$; tempo de imobilidade, $F_{1, 18} = 0,1400$, $p = 0,7127$; tempo no centro, $F_{1, 18} = 0,09166$, $p = 0,7656$; tempo na periferia, $F_{1, 18} = 0,1049$, $p = 0,7497$; entradas no centro, $F_{1, 18} = 0,2138$, $p = 0,6493$; entradas na periferia, $F_{1, 18} = 0,1244$, $p = 0,7284$) (Figura 11 A-F). Com relação à intensidade, verificou-se diferença entre os grupos 0,45 e 0,65mA apenas na distância percorrida (*two-way* ANOVA, $F_{1, 17} = 8,351$, $p = 0,0102$) e no tempo de imobilidade (*two-way* ANOVA, $F_{1, 18} = 11,93$, $p = 0,0028$) (não representados na imagem). Resumindo, não houve diferença entre os animais controle e estressados para nenhum dos parâmetros já citados. Nos parâmetros em que houve diferença significativa das médias o valor de p não foi significativo ao comparar os animais controles e estressados em 0,45 ou 0,65 mA.

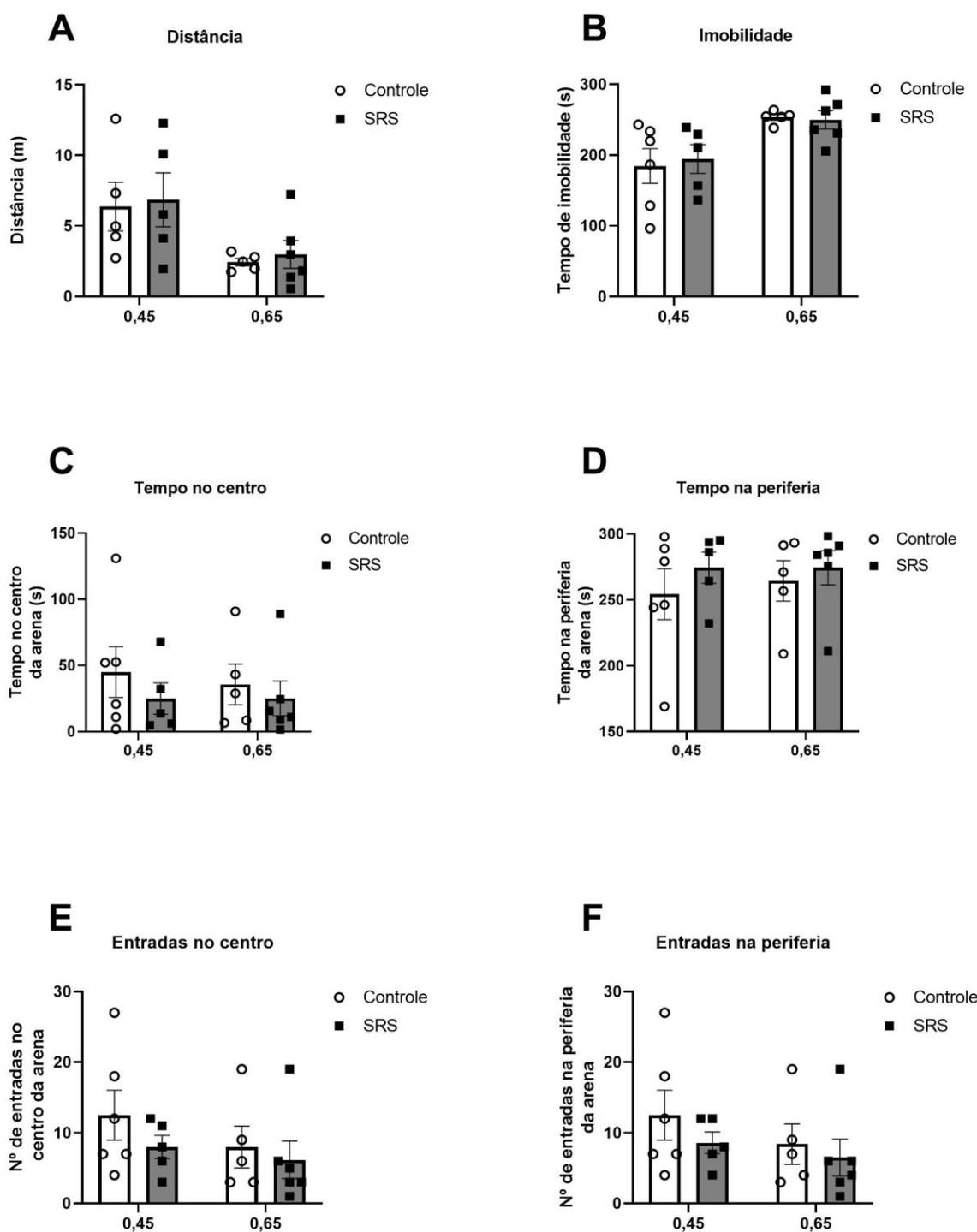


Figura 11. Ratos Wistar expostos ao teste do campo aberto ao final do protocolo estabelecido não apresentaram mudanças nos parâmetros comportamentais observados quando comparados com seus respectivos controles da intensidade de choque. Os animais foram distribuídos entre os grupos controle 0,45mA (n=6), SRS 0,45mA (n=5), controle 0,65 (n=5) e SRS 0,65 (n=6). **A)** distância em metros (m) percorrida pelo animal na arena **B)** tempo total em segundos (s) em que o animal permaneceu imóvel no aparato **C)** tempo total em segundos (s) de permanência

no centro do aparato, **D**) tempo total em segundos (s) de permanência periferia, **E**) número absoluto de entradas na porção central, **F**) número absoluto de entradas na periferia da arena. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM e foram submetidos à ANOVA *one-way*.

O último experimento da padronização foi realizado com o intuito de verificar se o isolamento dos animais por um período de sete dias após a sessão de extinção da memória de medo contextual seria por si só responsável pelo aumento no percentual de freezing dos animais estressados no MCC (Grupo controle isolado, n = 9, controle agrupado, n = 10, SRS, n = 11). Dessa forma, durante o condicionamento todos os animais tiveram uma resposta de aquisição da memória que variou ao longo do tempo e da condição de estresse a que foram submetidos (*two-way* ANOVA para interação, $F_{18, 243} = 2,447$, $p = 0,0012$), apenas do tempo (*two-way* ANOVA para tempo, $F_{3,765, 101,6} = 103,6$, $p < 0,0001$), mas não quando se tratava somente da condição (*two-way* ANOVA para condição, $F_{2, 27} = 3,251$, $p = 0,0543$) apesar de haver uma tendência (Figura 12). Ainda foi possível verificar que todos os três grupos apresentaram aumento significativo na resposta de *freezing* nos dois minutos finais da sessão de condicionamento quando comparado com o primeiro minuto da mesma sessão (Tabela 2).

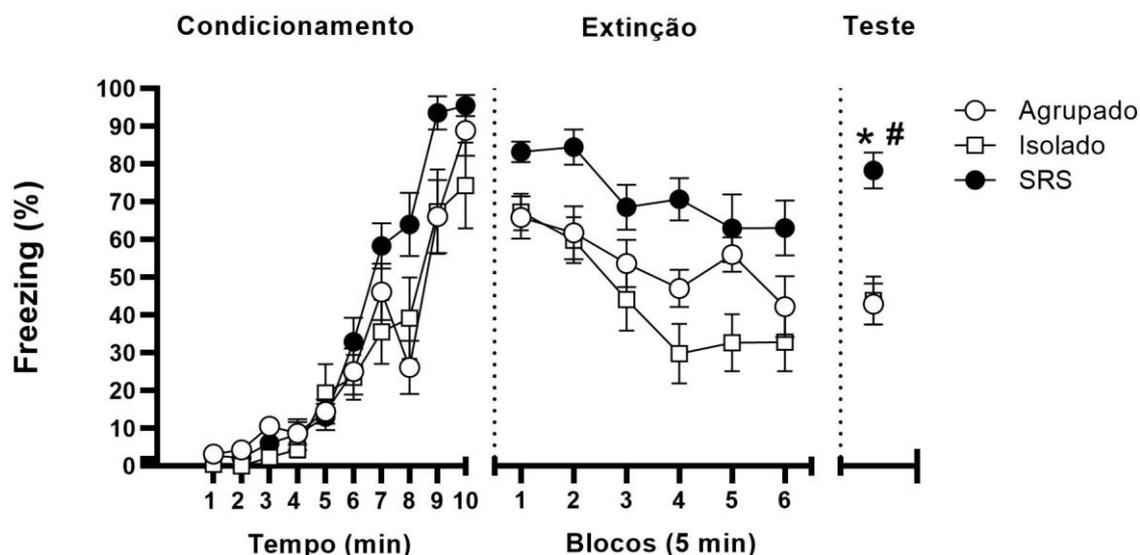


Figura 12. Perfil temporal de condicionamento, extinção e teste de retenção da memória de extinção do medo condicionado ao contexto de ratos Wistar submetidos a diferentes formas de agrupamento demonstrando prejuízo na extinção da memória de medo condicionado ao contexto em animais previamente estressados. Os animais foram divididos entre os grupos experimentais agrupado (n=9), isolado (n=10) e estressados e isolados (n=11). Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) pelo tempo total de 10min., 30min. e 5min. para o condicionamento, extinção e teste, respectivamente. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p = 0,0003$ quando comparado com o grupo isolado; # * *posthoc* de Tukey indica valor de $p = 0,0003$ quando comparado com o grupo agrupado.

Tabela 2. Resultado da análise *posthoc* de Tukey comparando o primeiro e os dois últimos minutos da sessão de condicionamento ao contexto de grupos controle e estressados submetidos a diferentes formas de agrupamento.

Grupo	1º minuto vs. 9º minuto	1º minuto vs. 10º minuto
Agrupado	P = 0,0038	P < 0,0001
Isolado	P = 0,0045	P = 0,0024
SRS	P < 0,0001	P < 0,0001

Durante a sessão de extinção da memória de medo houve diferença na resposta de *freezing* ao longo do tempo (*two-way* ANOVA para tempo, $F_{4,058, 109,6} = 18,69$, $p < 0,0001$) e que também variou com relação ao tipo de agrupamento em que os animais foram submetidos (*two-way* ANOVA para condição, $F_{2, 27} = 7,641$, $p = 0,0023$), porém sem nenhuma interação entre os fatores (*two-way* ANOVA para interação, $F_{10, 135} = 1,701$, $p = 0,0866$) (Figura 12). Nos primeiros cinco minutos os animais estressados apresentaram porcentagem de *freezing* maior que os demais grupos (*one-way* ANOVA, $F_{2, 27} = 5,003$, $p = 0,0142$) e esse valor foi estatisticamente diferente dos animais que permaneceram agrupados (*posthoc* de Tukey, $p = 0,0255$) e também dos que foram isolados (*posthoc* de Tukey, $p = 0,0367$) (Figura 13). Nos últimos minutos da extinção também houve diferença entre os grupos experimentais (*one-way* ANOVA, $F_{2, 27} = 4,303$, $p = 0,0239$) apontando para um prejuízo na capacidade de adquirir a nova memória (extinguir a memória de condicionamento) vista nos animais estressados em contraste com os animais que permaneceram isolados (*posthoc* de Tukey, $p = 0,0215$), mas sem diferir dos animais que permaneceram agrupados (*posthoc* de Tukey, $p = 0,1543$). Em contrapartida, ao comparar a expressão do medo com os últimos minutos da extinção de forma individual todos os grupos avaliados apresentaram uma diminuição na porcentagem de *freezing* significativa (Agrupado, Teste t pareado, $t = 2,650$, $df = 8$, $p = 0,0293$; Isolado, Teste t pareado, $t = 7,499$, $df = 9$, $p < 0,0001$; SRS, Teste t pareado, $t = 2,652$, $df = 10$, $p = 0,0242$). Portanto, os grupos agrupado, isolado e SRS apresentam uma diminuição na porcentagem de *freezing* do início da extinção comparado com os últimos cinco minutos, porém os animais SRS ainda apresentam um valor maior comparado com os animais isolados indicando um prejuízo na aquisição da nova memória (Figura 14-A).

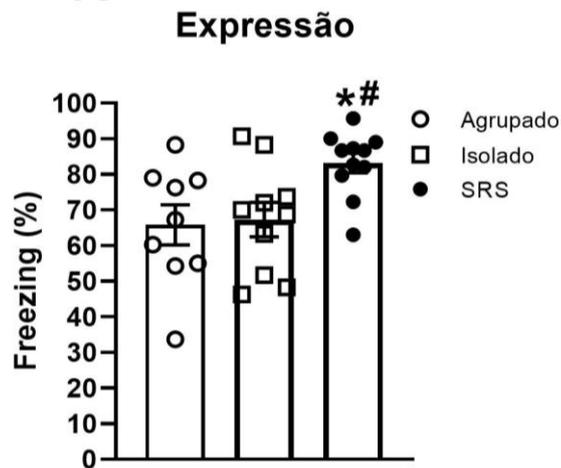


Figura 13. Expressão do medo condicionado ao contexto (5min. iniciais da sessão de extinção) de animais controles que permaneceram agrupados ou que foram isolados 7 dias após a sessão de extinção e animais estressados. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com controle agrupado; # * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com animais isolados.

No dia do teste de retenção da memória de extinção verificou-se diferença significativa no percentual de freezing do grupo estressado e dos controles (*one-way* ANOVA, $F_{2,27} = 14,01$, $p < 0,0001$), mostrando que mesmo após o processo de extinção da memória de condicionamento os animais estressados tendem a reter a memória de medo ao contexto quando comparados com os animais controle que permaneceram sete dias após a extinção agrupados (*posthoc* de Tukey, $p = 0,0003$) ou que foram submetidos ao isolamento (*posthoc* de Tukey, $p = 0,0003$) (Figura 14). Com relação à porcentagem de *freezing* avaliado nos últimos cinco minutos da extinção em comparação com o dia do teste não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos controle agrupado (Teste t pareado, $t = 0,08924$, $df = 8$, $p = 0,9311$) e isolado (Teste t pareado, $t = 1,814$, $df = 9$, $p = 0,1030$), porém o grupo estressado apresentou um aumento desse percentual no dia teste (Teste t pareado, $t = 2,250$, $df = 10$, $p = 0,0482$) (Figura 14-A e B). Dessa forma, o isolamento dos animais estressados não aparenta ser um dos fatores que contribuiu para o prejuízo na extinção da memória de medo contextual, indicando que a sequência estressora prévia ao protocolo de condicionamento atuou como principal causador do fenótipo tipo TEPT em ratos Wistar.

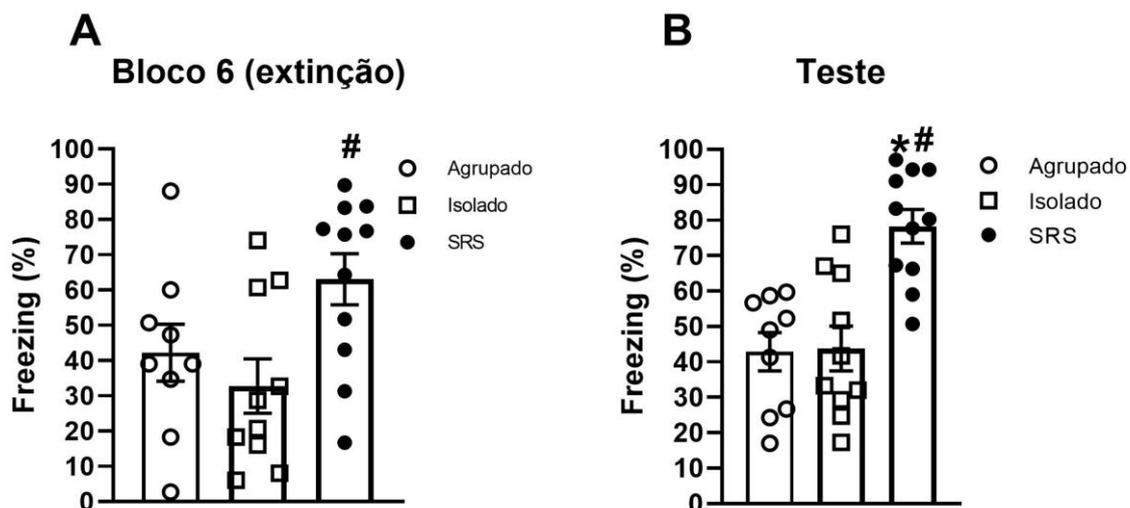


Figura 14. Últimos 5min. da sessão de extinção do medo condicionado (A) e dia do teste de retenção da memória de extinção (B) de animais controles que permaneceram agrupados ou que foram isolados 7 dias após a sessão de extinção e animais estressados. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) avaliados nos últimos cinco minutos da sessão de extinção e no dia do teste. * * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com controle agrupado; # * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com animais isolados.

Quanto ao teste do campo aberto os animais estressados tiveram menor distância percorrida no aparato (*one-way* ANOVA, $F_{2, 27} = 6,793$, $p = 0,0041$) quando comparados com os animais controles agrupados (*posthoc* de Tukey, $p = 0,0071$) e isolados (*posthoc* de Tukey, $p = 0,0216$) e menor número de entradas na periferia (*one-way* ANOVA, $F_{2, 27} = 3,779$, $p = 0,0357$) apresentando uma tendência em comparação com os animais agrupados somente (*posthoc* de Tukey, $p = 0,0530$). Nos parâmetros de tempo de imobilidade (*one-way* ANOVA, $F_{2, 27} = 2,933$, $p = 0,0704$), entradas no centro do aparato (*one-way* ANOVA, $F_{2, 27} = 3,292$, $p = 0,0526$), tempo no centro (*one-way* ANOVA, $F_{2, 27} = 0,1259$, $p = 0,8822$) e tempo na periferia (*one-way* ANOVA, $F_{2, 27} = 0,1255$, $p = 0,8826$) não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (Figura 15).

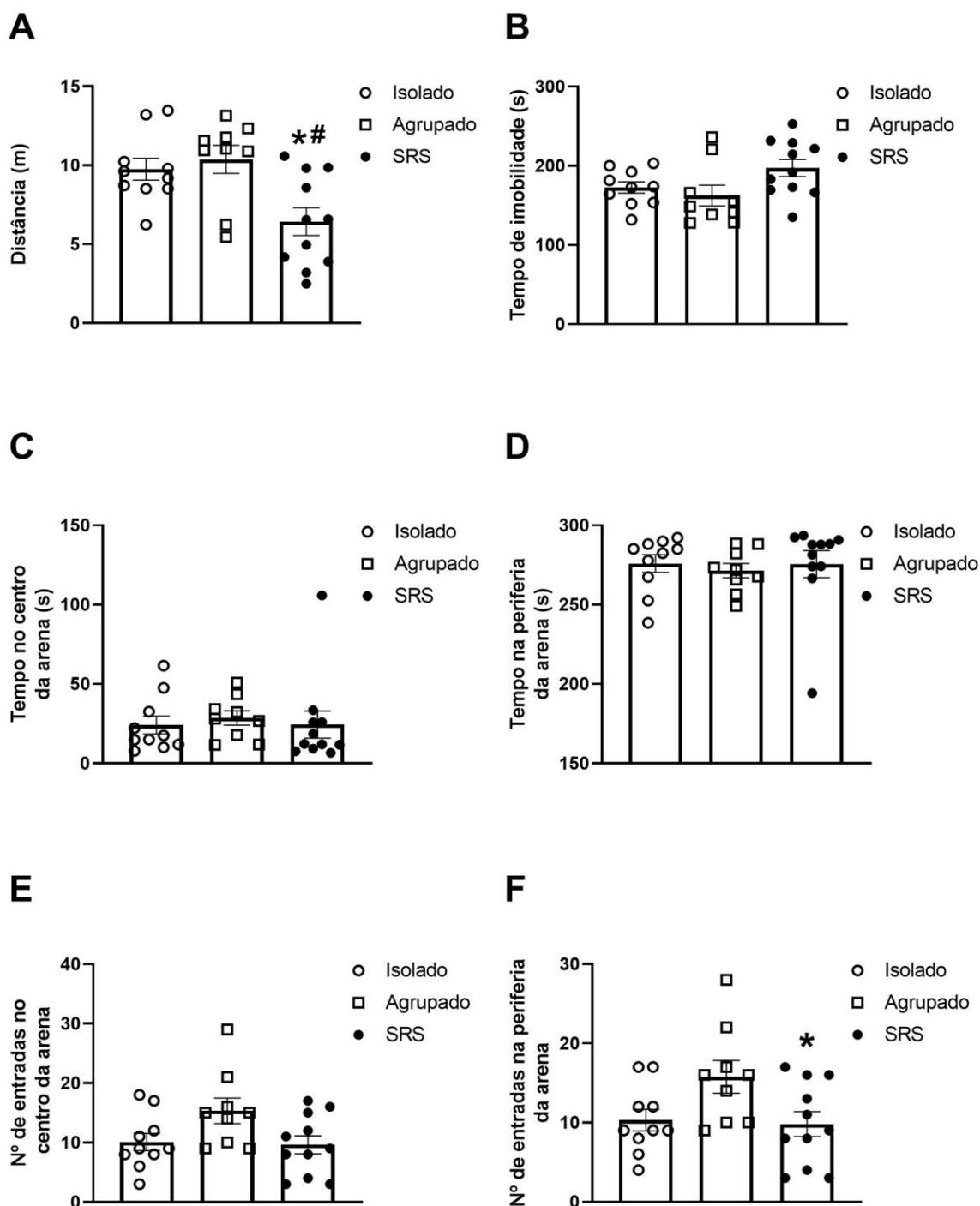


Figura 15. Ratos Wistar expostos ao teste do campo aberto 18 dias após serem submetidos ao protocolo de estresse-reestresse seguido do modelo de medo condicionado ao contexto apresentaram mudanças em alguns dos parâmetros comportamentais observados comparados com animais controle. Os animais foram distribuídos entre os grupos agrupado, isolado e SRS (estresse-reestresse). **A**) distância (m) percorrida pelo animal na arena **B**) tempo (s) total em que o animal permaneceu imóvel no aparato **C**) tempo (s) dispendido no centro do aparato e **D**)

na periferia **E**) número absoluto de entradas na porção central **F**) e na periferia da arena. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM e foram submetidos à ANOVA *one-way*. * * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ comparado com grupo agrupado, # * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ comparado com grupo isolado.

4.2 Efeito da administração sistêmica de agonista PPAR γ na resposta de medo condicionado ao contexto em animais submetidos ao modelo de SRS

Com o término da padronização do modelo de TEPT o experimento seguinte foi realizado administrando de maneira subcrônica (por sete dias) Pioglitazona em diferentes doses (Controle não estressado + veículo, $n = 7$, controle SRS + veículo, $n = 7$, 0,1, $n = 6$, 1, $n = 6$, e 10 mg/kg, $n = 7$) a fim de verificar se a ativação dos receptores PPAR γ seria capaz de reverter os efeitos deletérios causados à consolidação da memória de extinção pelo estresse prévio ao condicionamento ao contexto. Sendo assim, durante a sessão de condicionamento os animais foram capazes de adquirir a memória de medo de forma semelhante e sem diferença entre os grupos (*two-way* ANOVA para interação, $F_{36, 216} = 0,5843$, $p = 0,9721$; para tratamento, $F_{4, 24} = 0,7599$, $p = 0,5616$), mas ao longo do tempo a resposta de *freezing* tende a aumentar (*two-way* ANOVA para tempo, $F_{3,507, 84,16} = 193,8$, $p < 0,0001$) (Figura 16). Todos os grupos apresentaram diferença entre o primeiro minuto do condicionamento e o último com exceção do grupo Pioglitazona 10 mg/kg que no penúltimo minuto apresentou apenas uma tendência estatística (Tabela 3).

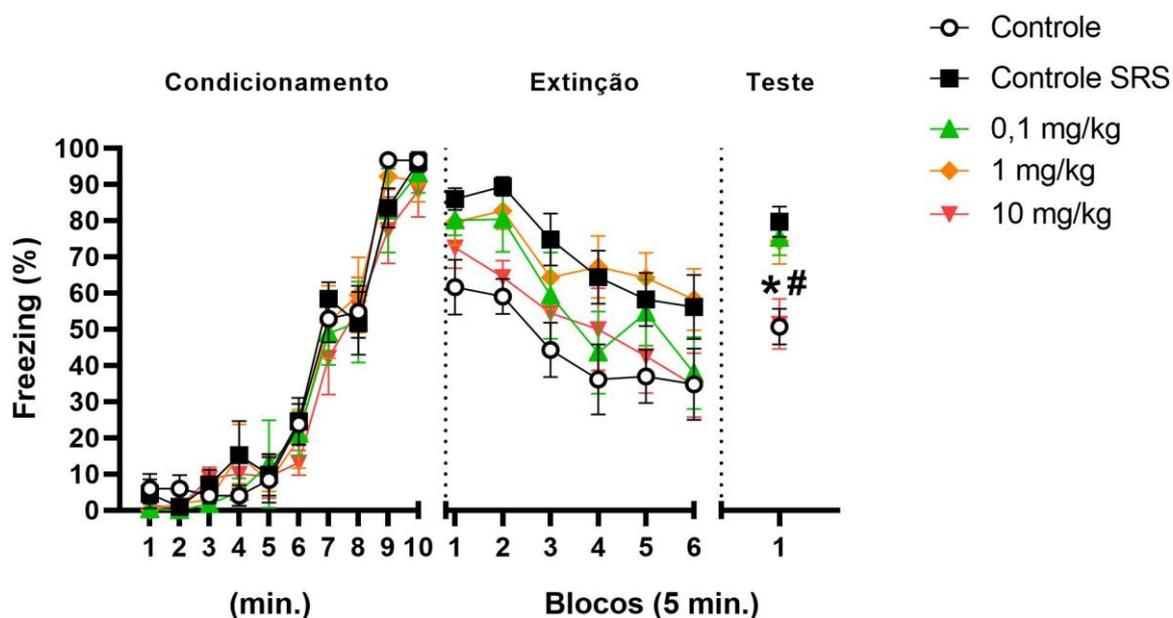


Figura 16. Perfil temporal de condicionamento, extinção e teste de retenção da memória de extinção do medo condicionado ao contexto de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de Pioglitazona (doses 0,1, 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (DMSO + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. A pioglitazona na maior dose foi capaz de reverter o prejuízo na consolidação da memória de extinção causado pelo estresse. Os animais foram divididos entre os grupos experimentais controle + veículo (n= 7), controle SRS + veículo (n=7), Pioglitazona na dose de 0,1 mg/kg (n=6), 1 mg/kg (n=6) e 10 mg/kg (n=7). Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) pelo tempo total de 10 min, 30min e 5min para o condicionamento, extinção e teste, respectivamente. * * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle SRS; # * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com os grupos Pioglitazona 0,1 e 1 mg/kg.

Tabela 3. Resultado da análise *posthoc* de Tukey comparando o primeiro e os dois últimos minutos da sessão de condicionamento ao contexto de grupos controle e estressados que receberam a administração de veículo ou Pioglitazona em diferentes doses por sete dias após a sessão de extinção.

Grupo	1º minuto vs. 9º minuto	1º minuto vs. 10º minuto
Controle	P < 0,0001	P < 0,0001
Controle SRS	P = 0,0003	P = 0,0002
Pioglitazona 0,1 mg/kg	P = 0,0106	P = 0,0001
Pioglitazona 1 mg/kg	P < 0,0001	P = 0,0002
Pioglitazona 10 mg/kg	P = 0,0517	P = 0,0126

Na sessão de extinção da memória de medo houve diferença na resposta de freezing ao longo do tempo apenas (*two-way* ANOVA para tempo, $F_{4,326, 112,5} = 25,88$, $p < 0,0001$) mas não teve nenhum tipo de interação entre as variáveis (*two-way* ANOVA, $F_{20, 30} = 0,7930$, $p = 0,7181$) ou diferença entre os grupos de tratamento (*two-way* ANOVA, $F_{4, 26} = 0,6756$, $p = 0,6150$) (Figura 16). Quanto à expressão do medo condicionado, nos primeiros cinco minutos da extinção verificou-se diferença na expressão da resposta inicial de *freezing* apenas para o grupo controle x SRS (*one-way* ANOVA, $F_{4, 28} = 2,882$, $p = 0,0407$; *posthoc* de Tukey, $p = 0,289$) que foi maior que a do grupo controle. O mesmo não ocorreu nos últimos cinco minutos (*one-way* ANOVA, $F_{4, 28} = 1,641$, $p = 0,1919$) para nenhum dos grupos. Ao realizar uma comparação intragrupo da expressão com os últimos minutos da extinção verificou-se que todos os grupos obtiveram um menor porcentual de *freezing* nos minutos finais da sessão (Teste t pareado controle SRS, $t = 4,092$ $df = 6$, $p = 0,0064$; Teste t pareado Pioglitazona 0,1 mg/kg, $t = 4,154$, $df = 5$, $p = 0,0089$; Teste t pareado Pioglitazona 1 mg/kg, $t = 3,820$, $df = 5$, $p = 0,0124$; Teste t pareado Pioglitazona 10 mg/kg, $t = 3,082$, $df = 6$, $p = 0,0216$), com exceção do grupo controle que não apresentou diferença entre os dois momentos (Figura 17 e 18-A)

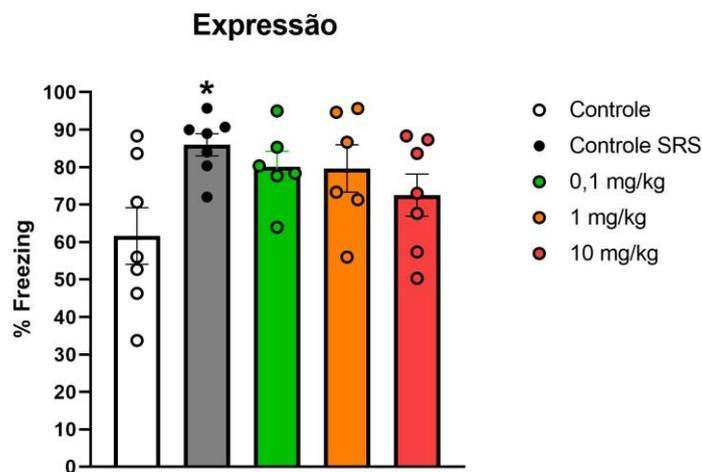


Figura 17. Expressão do medo condicionado ao contexto (5min iniciais da sessão de extinção) (A) e últimos 5 minutos da sessão de extinção do medo condicionado (B) de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de Pioglitazona (doses 0,1, 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (DMSO + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) que foram avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * * *posthoc* de Tukey indica $p < 0.05$ com relação ao grupo controle.

No dia do teste de retenção da memória de extinção verificou-se que os animais estressados que foram tratados com Pioglitazona na dose de 10 mg/kg ao longo dos sete dias após a extinção tiveram uma resposta porcentual de freezing bem menor no dia do teste de retenção da memória quando comparado com o grupo controle SRS (*one-way ANOVA*, $F_{4, 28} = 6,683$, $p = 0,0007$; controle SRS vs. Pioglitazona 10 mg/kg, *posthoc Tukey* $p = 0,0085$). Além disso, os grupos controle SRS e Pioglitazona 0,1 mg/kg obtiveram valores de *freezing* maior do que os dos animais controle (*one-way ANOVA*, $F_{4, 28} = 6,683$, $p = 0,0007$; controle vs controle SRS, $p = 0,0066$; controle vs Pioglitazona 0,1 mg/kg, $p = 0,0420$) (Figura 18-B). A resposta de *freezing* durante os minutos finais da extinção acabou aumentando de forma significativa sete dias depois quando avaliado durante o teste, ocorrendo nos grupos controle SRS (Teste t pareado, $t = 4,239$, $df = 6$, $p = 0,0054$), Pioglitazona 0,1 mg/kg (Teste t pareado, $t = 4,703$, $df = 5$, $p = 0,0053$) e Pioglitazona 1 mg/kg (Teste t pareado, $t = 2,899$, $df = 5$, $p = 0,0338$) e Pioglitazona 10 mg/kg (Teste t pareado, $t = 2,470$, $df = 6$, $p = 0,0485$). Já os animais controle não estressados (Teste t pareado, $t = 1,306$, $df = 6$, $p = 0,2394$) não diferiram quanto à resposta de *freezing* (Figura 18 A comparada com B). Em síntese, a Pioglitazona na dose de 10 mg/kg foi capaz de reverter o prejuízo na consolidação da memória de extinção causado pelo modelo de estresse-reestresse no qual os animais foram submetidos previamente à formação da memória de medo contextual.

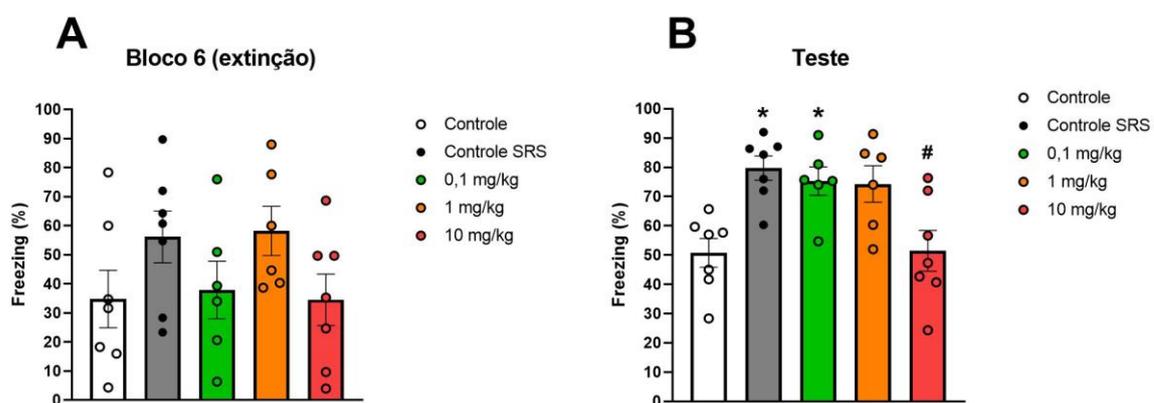


Figura 18. Últimos 5min da sessão de extinção do medo condicionado (**A**) e dia do teste de retenção da memória de extinção (**B**) de animais de ratos Wistar que receberam administração subcrônica intraperitoneal de Pioglitazona (doses 0,1, 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (DMSO + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) avaliados nos últimos cinco minutos da sessão de extinção e no dia do teste. * * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com controle; # *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com controle SRS

Por fim, no teste do campo aberto realizado 24h após o teste de retenção da memória não foram encontradas alterações locomotoras ou comportamentais para nenhum dos grupos experimentais (*one-way* ANOVA, distância percorrida, $F_{4, 19} = 2,089$, $p = 0,1224$; tempo de imobilidade, $F_{4, 19} = 1,817$, $p = 0,1671$; tempo no centro, $F_{4, 19} = 0,9342$, $p = 0,4652$; tempo na periferia, $F_{4, 19} = 0,9342$, $p = 0,4652$; entradas no centro, $F_{4, 19} = 0,4572$, $p = 0,7661$; entradas na periferia, $F_{4, 19} = 0,5975$, $p = 0,6689$) (Figura 19).

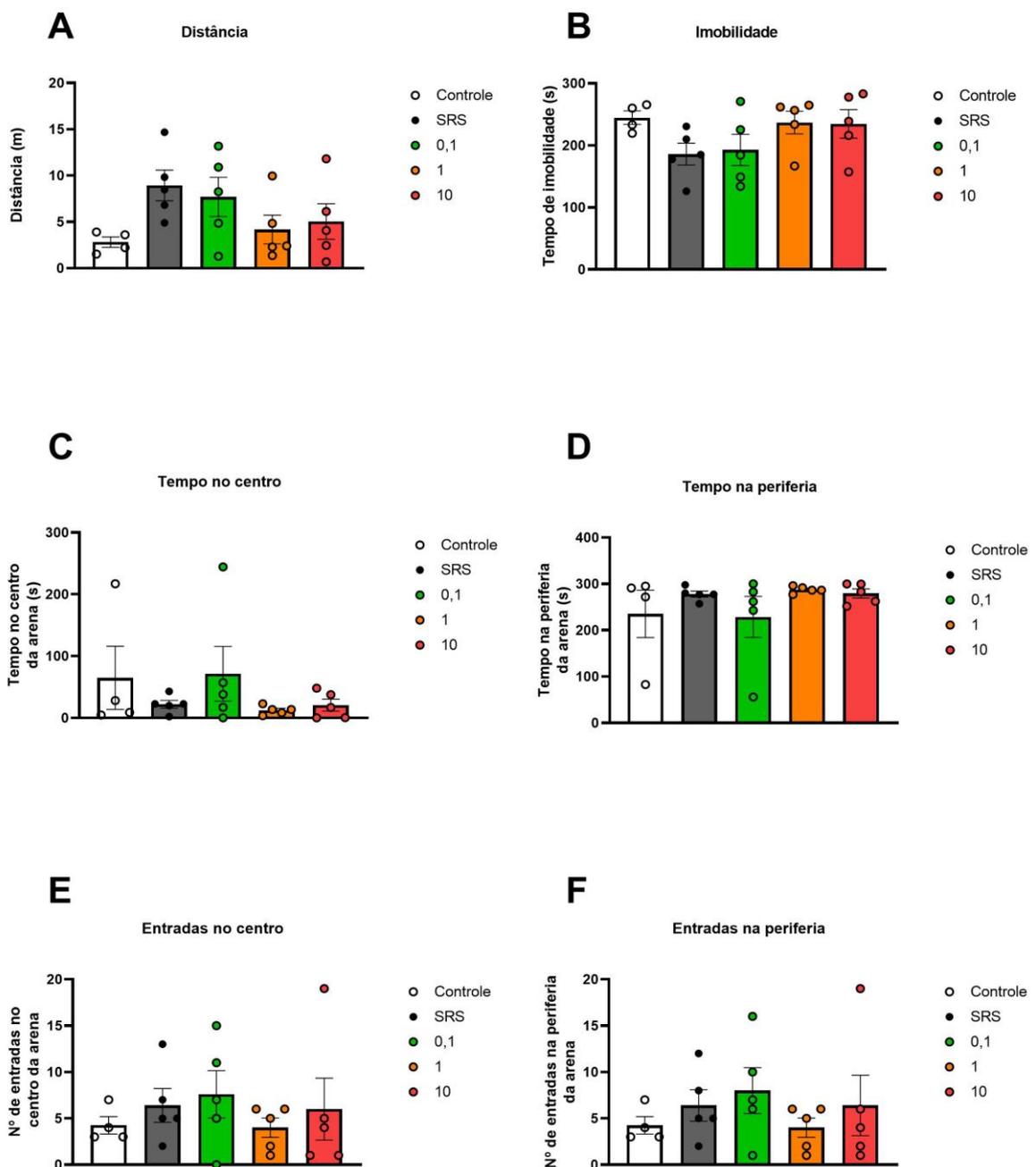


Figura 19. Ratos Wistar expostos ao teste do campo aberto 18 dias após serem submetidos ao protocolo de estresse-reestresse seguido do modelo de medo condicionado ao contexto não apresentaram mudanças nos parâmetros comportamentais observados quando receberam administração subcrônica intraperitoneal de Pioglitazona (doses 0,1, 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (DMSO 1% + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Os animais foram distribuídos entre os grupos controle (n= 4), controle SRS (n=5), Pioglitazona na dose de 0,1 mg/kg (n=5), 1 mg/kg (n=5) e 10 mg/kg (n=5) **A)** distância (m) percorrida pelo animal na arena **B)** tempo (s) total em que o animal permaneceu imóvel no aparato **C)** tempo (s) dispendido no centro do aparato e **D)** na periferia **E)** número absoluto de entradas na porção central **F)** e na periferia da arena. Os dados estão representados na forma de média ± EPM e foram submetidos à ANOVA *one-way*.

4.3 Efeito da administração aguda sistêmica de agonista PPAR γ na resposta de medo condicionado ao contexto em animais submetidos ao modelo de SRS

Partindo dos resultados da Pioglitazona, que ao ser administrada ao longo de sete dias foi capaz de exercer efeitos benéficos na consolidação da memória de extinção que estava prejudicada pelo estresse prévio ao condicionamento, foram feitas administrações de doses agudas após a extinção e 30 minutos antes do teste para averiguar se o efeito benéfico também ocorre com administrações agudas (Controle não estressado + veículo, n = 8, controle SRS + veículo, n = 9, Pioglitazona 10mg/kg dia 1, n = 13, e Pioglitazona 10mg/kg dia 7, n = 13). Dessa forma, durante o condicionamento os animais apresentaram resposta significativa para interação entre as variáveis tempo e tratamento (*two-way* ANOVA, $F_{27, 351} = 2,054$, $p = 0,0019$) e para o tempo (*two-way* ANOVA, $F_{4,706, 183,5} = 254,6$ $p < 0,0001$), indicando que o estresse associado com o tempo causou respostas diferentes nos grupos observados (Figura 20). Além disso, todos os grupos tiveram uma porcentagem de *freezing* significativamente maior nos últimos minutos da sessão de condicionamento (Tabela 6)

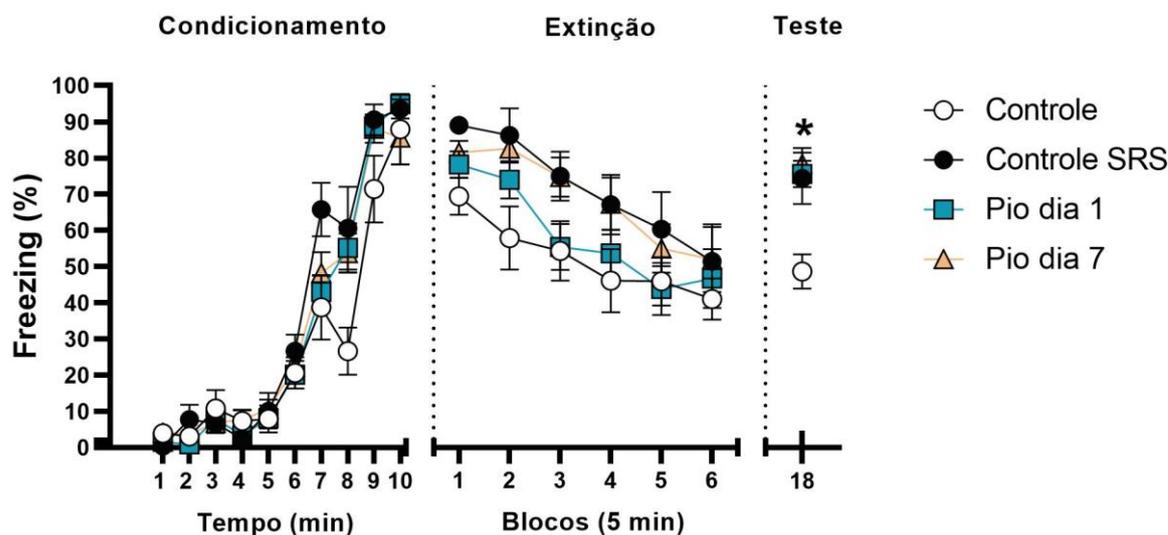


Figura 20. Perfil temporal de condicionamento, extinção e teste de retenção da memória de extinção do medo condicionado ao contexto de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de Pioglitazona (10 mg/kg) ou veículo (DMSO 1% + Tween 80) 24h após a sessão de extinção ou 30 minutos antes do dia do teste. Na condição de administração aguda a Pioglitazona teve sua capacidade de reverter os efeitos deletérios do estresse prévio ao condicionamento ao contexto anulada. Os animais foram divididos entre os grupos experimentais controle (n= 9), controle SRS (n=9), Pioglitazona administrada 24h após a extinção (n=13) e Pioglitazona administrada 30 min. antes da sessão de teste (n=13). Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) pelo tempo total de 10min, 30min e 5min para o condicionamento, extinção e teste, respectivamente. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando os grupos SRS, Pioglitazona dia 1 e Pioglitazona dia 7 foram comparados com o grupo controle

Tabela 4. Resultado da análise *posthoc* de Tukey comparando o primeiro e os dois últimos minutos da sessão de condicionamento ao contexto de grupos controle e estressados que receberam a administração de Pioglitazona (10mg/kg) 24h após a sessão de extinção ou 30min antes da sessão de teste.

Grupo	1º minuto vs. 9º minuto	1º minuto vs. 10º minuto
Controle	P = 0,0009	P = 0,0002
Controle SRS	P < 0,0001	P < 0,0001
Pioglitazona (10mg/kg) dia 1	P < 0,0001	P < 0,0001
Pioglitazona (10mg/kg) dia 7	P < 0,0001	P < 0,0001

Na sessão de extinção da memória de medo condicionado ao contexto constatou-se que não houve influência da interação entre o tratamento versus tempo (*two-way* ANOVA, $F_{15, 195} = 0,7415$, $p = 0,7402$) nem do tratamento (*two-way* ANOVA, $F_{3, 39} = 2,285$, $p = 0,0940$) na resposta de *freezing*, mas teve do tempo (*two-way* ANOVA, $F_{4,198, 163,7} = 29,67$, $p < 0,0001$) (Figura 20). A expressão do medo condicionado diferiu entre os grupos (*one-way* ANOVA, $F_{3, 40} = 1,006$, $p = 0,4000$; Figura 21) bem como nos últimos cinco minutos da extinção (*one-way* ANOVA, $F_{3, 39} = 4,041$, $p = 0,0135$; Figura 22-A), sendo maior no grupo estressado do que nos demais grupos (*posthoc* Tukey, $p = 0,0042$). Ao comparar o momento da expressão com os últimos minutos da extinção todos os grupos apresentam menores valores de *freezing* nesse último (controle, Teste pareado, $t = 7,127$, $df = 7$, $p = 0,0002$; controle SRS, teste t pareado, $t = 6,789$, $df = 8$, $p = 0,000$; Pioglitazona dia 1, teste t pareado, $t = 4,849$, $df = 12$, $p = 0,0004$; Pioglitazona dia 7, teste t pareado, $t = 4,058$, $df = 12$, $p = 0,0016$).

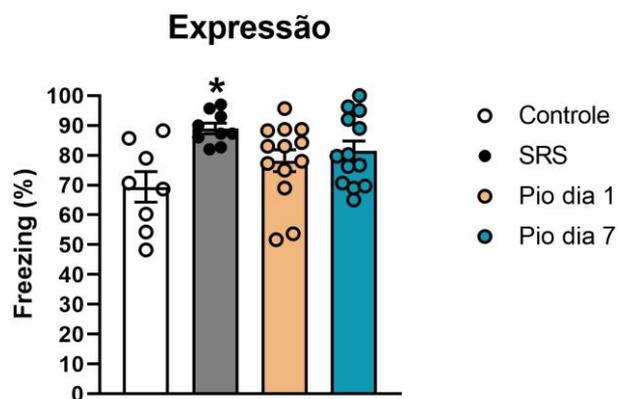


Figura 21. Expressão do medo condicionado ao contexto (5min iniciais da sessão de extinção) (A) e últimos 5 minutos da sessão de extinção do medo condicionado (B) de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de Pioglitazona (10 mg/kg) ou veículo (DMSO 1% + Tween 80) 24h após a sessão de extinção ou 30 minutos antes do dia do teste. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) que foram avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0.05$ quando comparado com o grupo controle

O dia do teste de retenção da memória de extinção indicou menor porcentual de freezing dos animais controle comparado com controle SRS (*one-way* ANOVA, $F_{3, 39} = 6,555$, $p = 0,0011$, *posthoc* de Tukey, $p = 0,0019$), Pioglitazona dia 1 (*one-way* ANOVA, $F_{3, 39} = 6,555$, $p = 0,0011$, *posthoc* de Tukey, $p = 0,0033$) e Pioglitazona dia 7 (*one-way* ANOVA, $F_{3, 39} = 6,555$, $p = 0,0011$, *posthoc* de Tukey, $p = 0,0011$) (Figura 22-B). Quando comparados os cinco minutos finais do dia da extinção e o dia do teste, com exceção do grupo controle (Teste t pareado, $t = 0,6399$, $df = 8$, $p = 0,5401$) os demais grupos apresentaram um aumento significativo no porcentual de *freezing* (Controle SRS, Teste t pareado, $t = 3,967$, $df = 8$, $p = 0,0041$; Pioglitazona dia 1, teste t pareado, $t = 3,826$, $df = 12$, $p = 0,0024$; Pioglitazona dia 7, teste t pareado, $t = 2,766$, $df = 12$, $p = 0,0171$) (Figura 22-A comparada com B). Desse modo, a administração aguda de Pioglitazona 24h após a extinção ou 30min antes do teste não é capaz de recuperar o prejuízo na consolidação da memória de extinção vista nos animais estressados previamente ao condicionamento ao contexto.

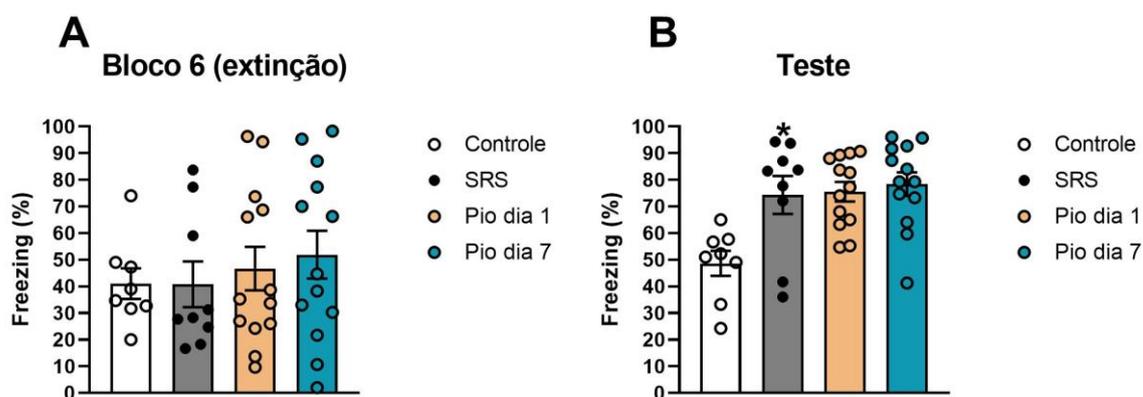


Figura 22. Últimos 5min da sessão de extinção do medo condicionado (**A**) e dia do teste de retenção da memória de extinção (**B**) de animais de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de Pioglitazona (10 mg/kg) ou veículo (DMSO 1% + Tween 80) 24h após a sessão de extinção ou 30min. antes do dia do teste. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) que foram avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

4.4 Efeito da administração sistêmica de agonista PPAR α na resposta de medo condicionado ao contexto em animais submetidos ao modelo de SRS

Sabendo que a Pioglitazona atua como agonista dos receptores PPAR γ e que o receptor PPAR α é uma das isoformas pertencente à mesma família de receptores, testou-se a hipótese de que a administração de agonista dos receptores PPAR α , em diferentes doses, também poderia demonstrar um papel na recuperação dos efeitos deletérios do estresse à consolidação da memória de extinção (Controle não estressado + veículo, n = 7, SRS + veículo, n = 7, 0,1, n = 6, 1, n = 6, e 10mg/kg, n = 7). Assim, durante o condicionamento (Figura 23) não houve interação entre o estresse prévio e o tempo (*two-way* ANOVA, $F_{36,252} = 0,8822$, $p = 0,6647$) e nem diferença somente com relação às diferentes doses de fenofibrato ou veículo que os animais receberam em seus respectivos grupos (*two-way* ANOVA, $F_{4,28} = 1,714$, $p = 0,1749$), porém, como esperado, houve diferença no tempo (*two-way* ANOVA, $F_{4,347, 121,7} = 177,3$, $p < 0,0001$) indicando principalmente que nos últimos minutos todos os grupos apresentaram uma resposta de *freezing* maior do que no minuto inicial (Tabela 4).

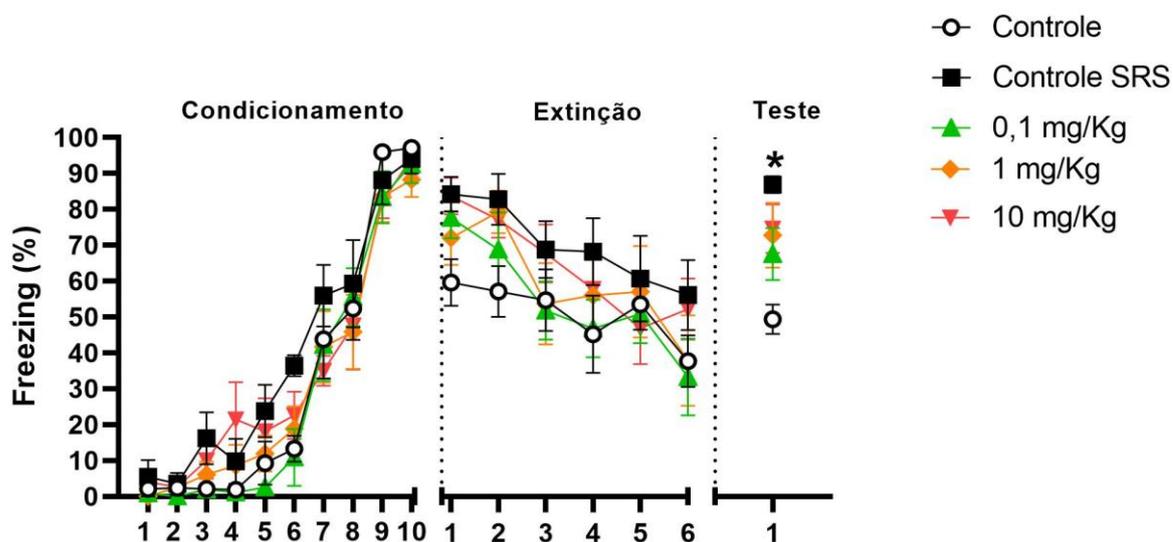


Figura 23. Perfil temporal de condicionamento, extinção e teste de retenção da memória de extinção do medo condicionado ao contexto de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de Fenofibrato (doses 0,1, 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (DMSO 10% + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Nenhuma das doses testadas de Fenofibrato foi capaz de causar efeito de redução do percentual de *freezing* de animais estressados previamente ao condicionamento ao contexto. Os animais foram divididos entre os grupos experimentais controle (n= 7), controle SRS (n=7), Fenofibrato na dose de 0,1 mg/kg (n=6), 1 mg/kg (n=6) e 10 mg/kg (n=6). Os valores estão expressos em porcentagem de *freezing* ± Erro Padrão da Média (EPM) pelo tempo total de 10min, 30 min e 5min para o condicionamento, extinção e teste, respectivamente. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle SRS; # *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com os grupos Fenofibrato 0,1 e 1 mg/kg.

Tabela 5. Resultado da análise *posthoc* de Tukey comparando o primeiro e os dois últimos minutos da sessão de condicionamento ao contexto de grupos controle e estressados que receberam a administração de veículo ou Fenofibrato em diferentes doses por sete dias após a sessão de extinção.

Grupo	1º minuto vs. 9º minuto	1º minuto vs. 10º minuto
Controle	P < 0,0001	P < 0,0001
Controle SRS	P = 0,0004	P < 0,0001
Fenofibrato 0,1 mg/kg	P = 0,0013	P = 0,0001
Fenofibrato 1 mg/kg	P = 0,0010	P = 0,0001
Fenofibrato 10 mg/kg	P < 0,0001	P < 0,0001

Na sessão de extinção da memória de medo condicionado ao contexto verificou-se que não houve diferença entre os grupos controles e Fenofibrato nos parâmetros de interação entre as variáveis (*two-way* ANOVA para interação, $F_{20, 140} = 0,9417$, $p = 0,5361$) nem para o tipo de tratamento (*two-way* ANOVA para tratamento, $F_{4, 28} = 1,174$, $p = 0,3437$), porém houve diferença significativa ao longo do tempo em que os animais foram avaliados (*two-way* ANOVA para interação, $F_{3,575, 100,1} = 22,03$, $p < 0,0001$) (Figura 23). Durante os primeiros cinco minutos dessa sessão (expressão), as médias da porcentagem de *freezing* dos grupos controle e controle SRS diferiram entre si (*one-way* ANOVA, $F_{4, 28} = 3,325$, $p = 0,0239$; *posthoc* Dunnet, $p = 0,0121$), mas o grupo controle SRS não diferiu dos demais grupos (Figura 24). Já nos cinco últimos minutos não houve uma diferença significativa entre as médias (*one-way* ANOVA, $F_{4, 28} = 1,088$, $p = 0,3814$) (Figura 25-A). A comparação do momento da expressão do medo com os minutos finais da extinção em cada grupo mostra, primeiramente, que os animais do grupo controle não diferiram do começo ao fim da sessão (Teste t pareado, $t = 2,330$, $df = 6$, $p = 0,0586$) quanto a sua resposta de *freezing*, porém há uma clara tendência que mostra que nos minutos finais há uma diminuição nesse porcentual. Os grupos: controle SRS (Teste t pareado, $t = 3,167$, $df = 6$, $p = 0,0194$), Fenofibrato 0,1 mg/kg (Teste t pareado, $t = 6,886$, $df = 5$, $p =$

0,0010), Fenofibrato 1 mg/kg (Teste t pareado, $t = 3,298$, $df = 5$, $p = 0,0215$) e Fenofibrato 10 mg/kg (Teste t pareado, $t = 5,279$, $df = 6$, $p = 0,0019$) apresentam uma redução significativa no mesmo parâmetro comportamental (Figura 25-A).

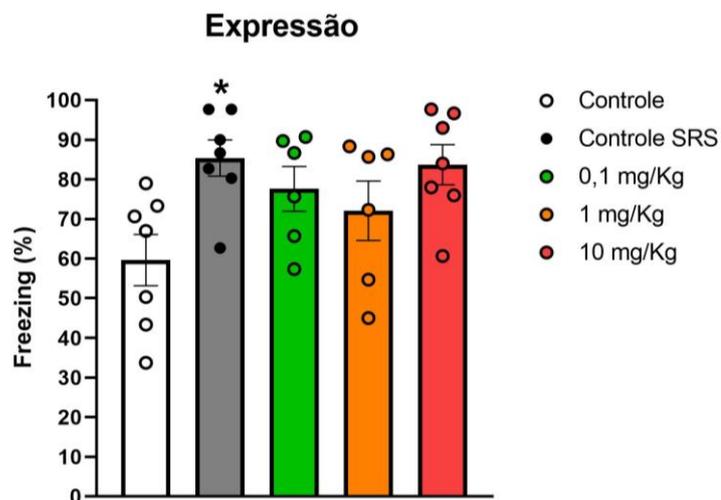


Figura 24. Expressão do medo condicionado ao contexto (5min iniciais da sessão de extinção) (A) e últimos 5 minutos da sessão de extinção do medo condicionado (B) de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de Fenofibrato (doses 0,1, 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (DMSO 10% + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) que foram avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle não estressado + veículo.

O dia do teste de retenção da memória de extinção somente aponta para diferença entre o porcentual de freezing dos animais controle comparado com controle SRS (*one-way* ANOVA, $F_{4, 28} = 5,265$, $p = 0,0027$, *posthoc* de Dunnet, $p = 0,0005$). Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas (Figura 25-B). Quando comparados os cinco minutos finais do dia da extinção com o dia do teste, apenas os grupos controle SRS (Teste t pareado, $t = 3,460$, $df = 6$, $p = 0,0135$), Fenofibrato 0,1 mg/kg (Teste t pareado, $t = 3,288$, $df = 5$, $p = 0,0218$), Fenofibrato 1 mg/kg (Teste t pareado, $t = 3,809$, $df = 5$, $p = 0,0125$) e Fenofibrato 10 mg/kg (Teste t pareado, $t = 4,504$, $df = 6$, $p = 0,0041$) apontaram para um incremento na resposta de *freezing* no dia do teste (Figura 25-A comparada com B). Desse modo, Fenofibrato não foi capaz de reverter o prejuízo causado pelo estresse na consolidação da memória de extinção indicando uma possível ausência de função nesse processo de formação de memória.

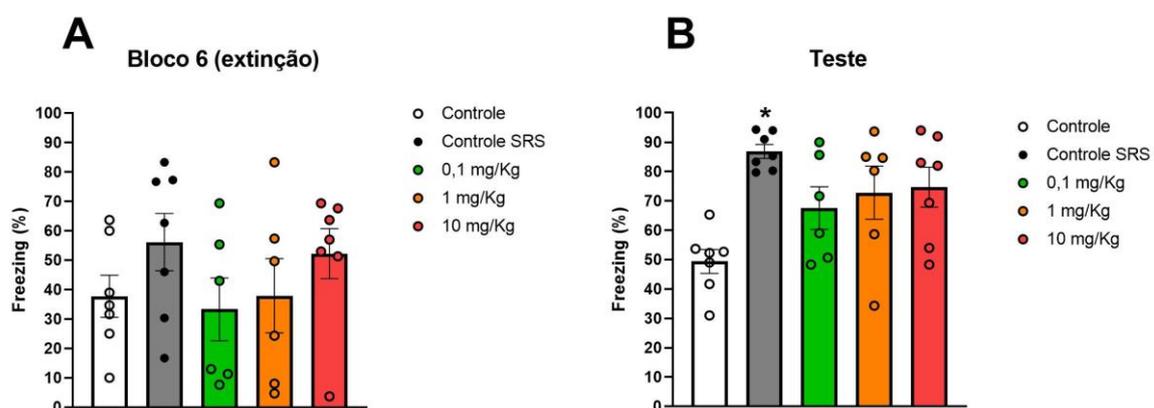


Figura 25. Últimos 5min da sessão de extinção do medo condicionado (**A**) e dia do teste de retenção da memória de extinção (**B**) de animais de ratos Wistar que receberam administração subcrônica intraperitoneal de Fenofibrato (doses 0,1, 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (DMSO + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) avaliados nos últimos cinco minutos da sessão de extinção e no dia do teste. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ quando comparado com controle não estressado.

No teste do campo aberto não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos experimentais analisados em nenhum dos parâmetros avaliados que foram distância (*one-way* ANOVA, $F_{4, 26} = 0,9559$, $p = 0,4481$), tempo de imobilidade (*one-way* ANOVA, $F_{4, 26} = 0,9845$, $p = 0,4332$), entradas no centro do aparato (*one-way* ANOVA, $F_{4, 26} = 1,103$, $p = 0,3762$), tempo no centro (*one-way* ANOVA, $F_{4, 26} = 0,7610$, $p = 0,5601$), entradas na periferia (*one-way* ANOVA, $F_{4, 26} = 1,013$, $p = 0,4187$) e tempo na periferia (*one-way* ANOVA, $F_{4, 26} = 0,7610$, $p = 0,5601$) (Figura 26).

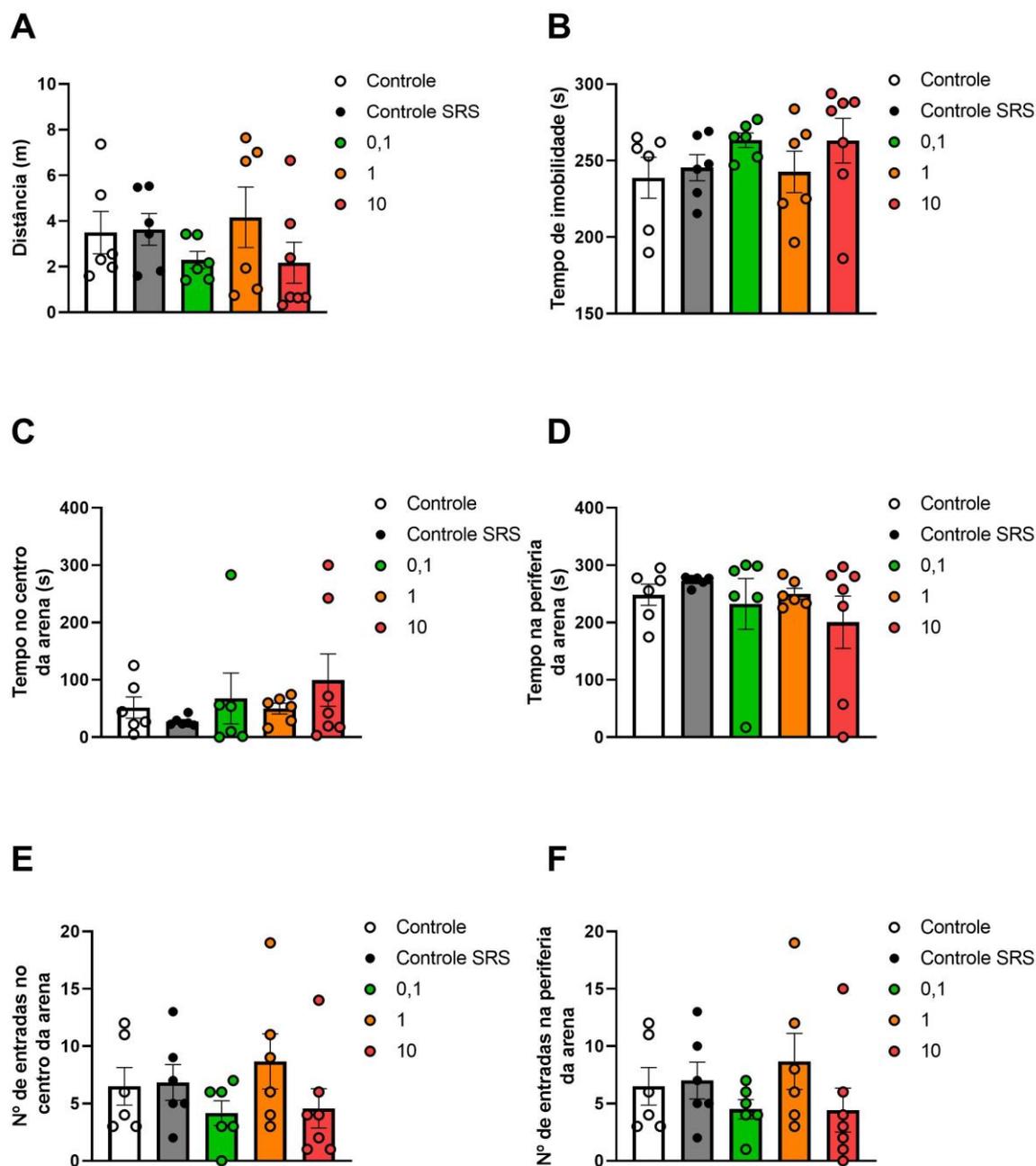


Figura 26. Ratos Wistar expostos ao teste do campo aberto 17 dias após serem submetidos ao protocolo de estresse-reestresse seguido do modelo de medo condicionado ao contexto não apresentaram mudanças em nenhum dos parâmetros comportamentais observados. Os animais foram distribuídos entre os grupos Controle (n=6), controle SRS (n=6), Fenofibrato 0,1 mg/kg (n=6), Fenofibrato 1 mg/kg (n=6), Fenofibrato 10 mg/kg (n=7). **A)** distância (m) percorrida pelo animal na arena **B)** tempo (s) total em que o animal permaneceu imóvel no aparato **C)** tempo (s) dispendido no centro do aparato e **D)** na periferia **E)** número absoluto de entradas na

porção central F) e na periferia da arena. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM.

4.5 Efeito da administração sistêmica de antagonista PPAR γ e PPAR α na resposta de medo condicionado ao contexto em animais submetidos ao modelo de SRS

Após os experimentos utilizando os agonistas tornou-se necessário testar se a dose baseada na literatura científica de 2 mg/kg dos antagonistas PPAR γ e PPAR α seria ineficaz nos grupos experimentais estudados (Controle não estressado + veículo, n = 8, SRS + veículo, n = 8, GW9662, n = 7, GW6471, n = 7). Posto isto, durante o condicionamento não houve interação entre o tipo de tratamento e o tempo (*two-way* ANOVA, $F_{27, 225} = 0,7905$, $p = 0,7622$) e nem diferença com relação ao tratamento aplicado (*two-way* ANOVA, $F_{3, 25} = 1,974$, $p = 0,1437$), porém, como esperado, houve diferença no tempo (*two-way* ANOVA, $F_{5, 198, 129,9} = 172,2$, $p < 0,0001$) indicando principalmente que a resposta de *freezing* tende a modificar-se ao longo do tempo (Figura 27). Assim sendo, todos os grupos apresentaram médias de *freezing* menores no primeiro minuto quando comparado com os dois últimos minutos do condicionamento (Tabela 5).

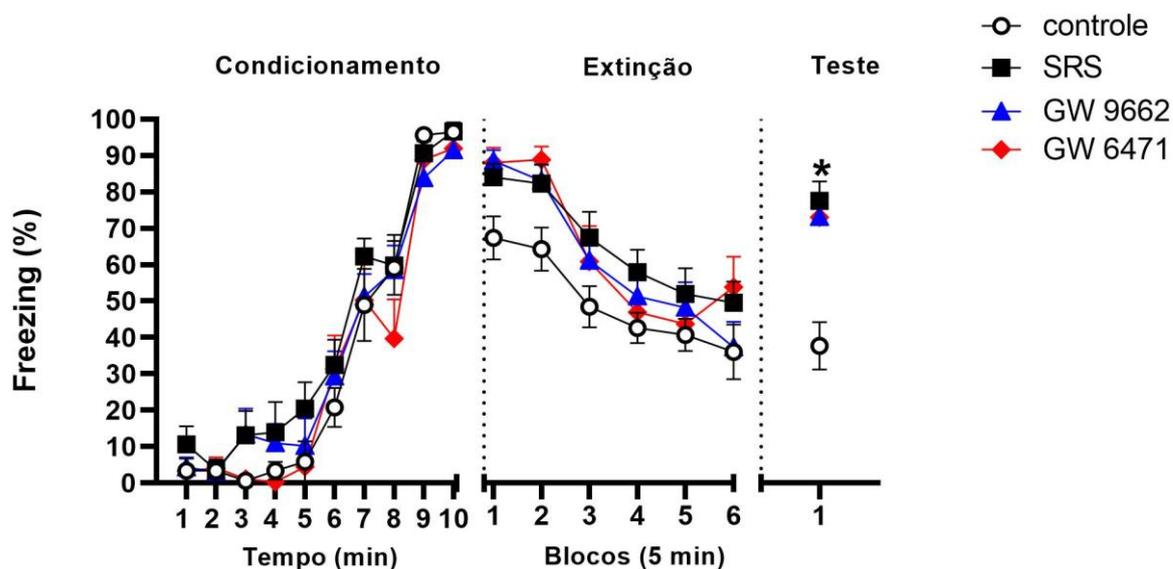


Figura 27. Perfil temporal de condicionamento, extinção e teste de retenção da memória de extinção do condicionado ao contexto de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de GW9662 ou GW6471 (dose 2 mg/kg) ou veículo (DMSO 1% ou 10% + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Nenhuma das doses testadas dos antagonistas foi capaz de causar efeito de redução do percentual de *freezing* de animais estressados previamente ao condicionamento ao contexto. Os animais foram divididos entre os grupos experimentais controle (n= 8), controle SRS (n=8), GW9662 (n=7) e GW6471 (n=6). Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) pelo tempo total de 10min, 30min e 5min para o condicionamento, extinção e teste, respectivamente. * *posthoc* de Tukey indica que os grupos controle, SRS, GW9662 e GW6471 obtiveram valor de $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

Tabela 6. Resultado da análise *posthoc* de Tukey comparando o primeiro e os dois últimos minutos da sessão de condicionamento ao contexto de grupos controle e estressados que receberam a administração de GW9662 ou GW6471 por sete dias após a sessão de extinção.

Grupo	1º minuto vs. 9º minuto	1º minuto vs. 10º minuto
Controle	P < 0,0001	P < 0,0001
Controle SRS	P < 0,0001	P < 0,0001
GW9662	P = 0,0005	P < 0,0001
GW6471	P = 0,0001	P < 0,0001

Na sessão de extinção da memória de medo condicionado ao contexto constatou-se que não houve influência da interação entre o tratamento versus tempo (*two-way* ANOVA, $F_{15, 125} = 0,7800$, $p = 0,6974$) na resposta de *freezing*, mas teve do tempo (*two-way* ANOVA, $F_{3,814, 95,35} = 37,01$, $p < 0,0001$) e do tratamento (*two-way* ANOVA, $F_{3, 25} = 3,139$, $p = 0,0431$) (Figura 27). Durante a expressão do medo condicionado houve diferença entre as médias de *freezing* (*one-way* ANOVA, $F_{3, 25} = 5,199$, $p = 0,0063$) dos grupos controle SRS (*posthoc* de Tukey, $p = 0,0482$), GW9662 (*posthoc* de Tukey, $p = 0,0112$) e GW6471 (*posthoc* de Tukey, $p = 0,0188$) em comparação com os animais controle não estressados (Figura 28). Nos últimos cinco minutos da extinção não houve nenhuma diferença entre os grupos (*one-way* ANOVA, $F_{3, 25} = 1,495$, $p = 0,2403$) (Figura 29-A). Contudo, ao comparar a expressão e os últimos minutos da extinção todos os grupos apresentaram menores valores de *freezing* à medida que a sessão de extinção se aproxima do fim (controle, Teste pareado, $t = 3,939$, $df = 7$, $p = 0,0056$; controle SRS, teste t pareado, $t = 5,431$, $df = 7$, $p = 0,0010$; GW9662, teste t pareado, $t = 7,050$, $df = 6$, $p = 0,0004$; GW6471, teste t pareado, $t = 3,502$, $df = 5$, $p = 0,0172$).

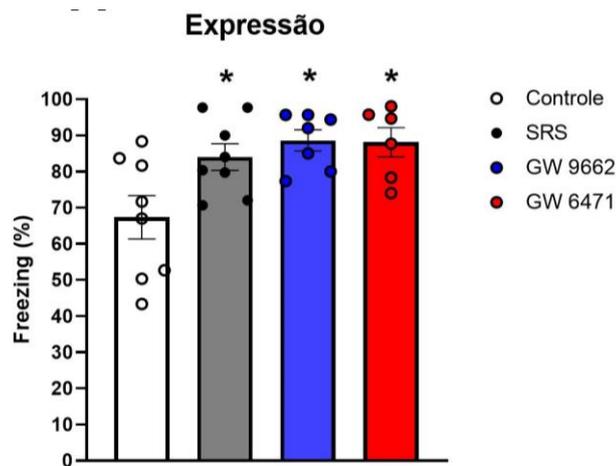


Figura 28. Expressão do medo condicionado ao contexto (5min iniciais da sessão de extinção) (A) e últimos 5 minutos da sessão de extinção do medo condicionado (B) de ratos Wistar que receberam administração intraperitoneal de GW9662 ou GW6471 (dose 2 mg/kg) ou veículo (DMSO 1% ou 10% + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) que foram avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

O dia do teste de retenção da memória de extinção indicou diferença entre o percentual de freezing dos animais controle comparado com controle SRS (*one-way* ANOVA, $F_{3, 27} = 11,16$, $p < 0,0001$, *posthoc* de Tukey, $p = 0,0001$), GW9662 (*posthoc* de Tukey, $p = 0,0009$) e GW6471 (*posthoc* de Tukey, $p = 0,0015$) (Figura 29-B). Quando comparados os cinco minutos finais do dia da extinção com o dia do teste, com exceção do grupo controle (Teste t pareado, $t = 0,1905$, $df = 7$, $p = 0,8543$) os demais grupos apresentaram um aumento significativo no percentual de *freezing* (Controle SRS, Teste t pareado, $t = 5,284$, $df = 7$, $p = 0,0011$; GW9662, teste t pareado, $t = 3,216$, $df = 6$, $p = 0,0182$; GW6471, teste t pareado, $t = 3,224$, $df = 5$, $p = 0,0234$) (Figura 29-A comparada com B). Desse modo, os dois antagonistas não causaram nenhum efeito relacionado à consolidação da memória de extinção na dose aplicada.

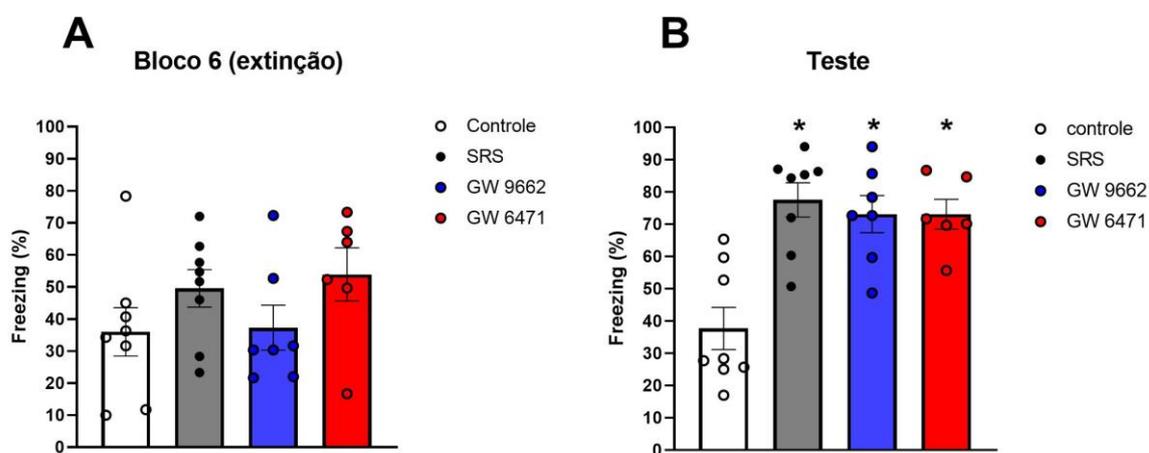


Figura 29. Últimos 5min da sessão de extinção do medo condicionado (**A**) e dia do teste de retenção da memória de extinção (**B**) de animais de ratos Wistar que receberam administração subcrônica intraperitoneal de GW9662 ou GW6471 (dose 2 mg/kg) ou veículo (DMSO 1% ou 10% + Tween 80) por sete dias após a sessão de extinção. Os valores estão expressos em porcentagem de freezing \pm Erro Padrão da Média (EPM) que foram avaliados nos primeiros e nos últimos cinco minutos da sessão de extinção. * *posthoc* de Tukey indica valor de $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

No teste do campo aberto não foi encontrado nenhuma diferença entre os grupos experimentais analisados em nenhum dos parâmetros avaliados que foram distância (*one-way* ANOVA, $F_{3, 19} = 2,291$, $p = 0,1110$), tempo de imobilidade (*one-way* ANOVA, $F_{3, 19} = 1,405$, $p = 0,2722$), entradas no centro do aparato (*one-way* ANOVA, $F_{3, 19} = 0,4972$, $p = 0,6886$), tempo no centro (*one-way* ANOVA, $F_{3, 19} = 0,2237$ $p = 0,8787$), entradas na periferia (*one-way* ANOVA, $F_{3, 19} = 0,5374$, $p = 0,3436$) e tempo na periferia (*one-way* ANOVA, $F_{3, 19} = 0,2272$, $p = 0,8763$) (Figura 30).

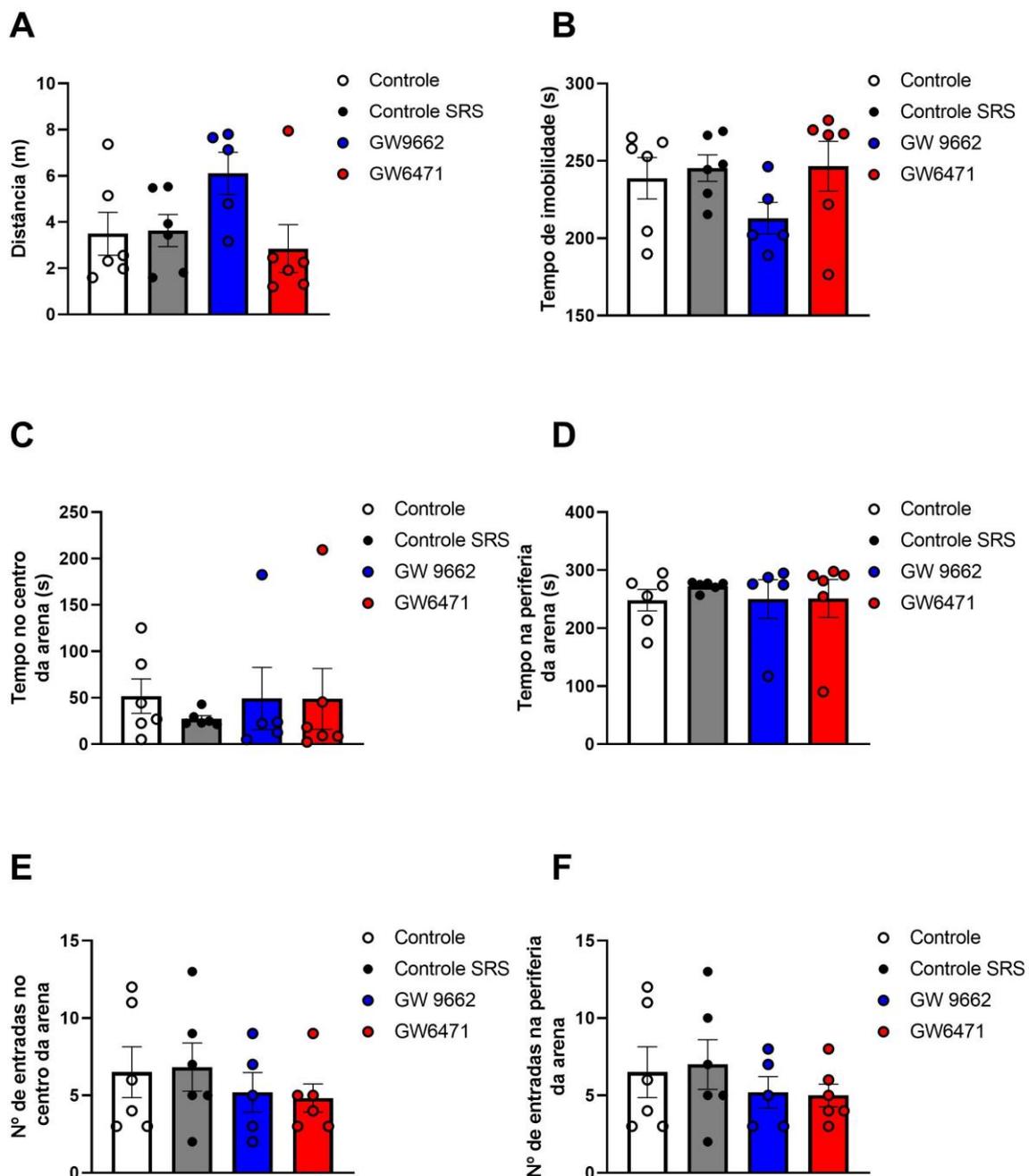


Figura 30. Ratos Wistar expostos ao teste do campo aberto 17 dias após serem submetidos ao protocolo de estresse-reestresse seguido do modelo de medo condicionado ao contexto não apresentaram mudanças em nenhum dos parâmetros comportamentais observados. Os animais foram distribuídos entre os grupos Controle (n=6), controle SRS (n=6), GW9662 (n=5) e GW6471 (n=6). **A)** distância (m) percorrida pelo animal na arena **B)** tempo (s) total em que o animal permaneceu imóvel no aparato **C)** tempo (s) dispendido no centro do aparato e **D)** na periferia **E)** número absoluto de entradas na porção central **F)** e na periferia da arena. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM.

5. Discussão

Os animais submetidos ao modelo de estresse-reestresse (SRS) apresentaram prejuízo na memória de extinção verificado pela manutenção de valores de freezing tão altos quanto 80% ao longo de todos os experimentos mesmo após sete dias da sessão de extinção da memória de medo previamente condicionada ao contexto quando pareado com um estímulo aversivo (choque nas patas). Esse fenômeno tem importância translacional pelo fato de pacientes com TEPT apresentarem dificuldade de extinguir memórias aversivas adquiridas em algum momento de suas vidas e também por evitarem ambientes que detenham qualquer tipo de associação com o contexto no qual o trauma foi instaurado (American Psychiatric Association, 2013; Kirkpatrick e Heller, 2014).

Os resultados deste estudo mostram que o tratamento com agonista do receptor PPAR γ (Pioglitazona) na dose de 10mg/kg iniciando 24h após a extinção da memória de medo condicionada ao contexto e permanecendo ao longo de 7 dias foi capaz de reverter os efeitos de prejuízo da extinção da memória aversiva ocasionados pelo estresse prévio à exposição ao paradigma do MCC ao diminuir os valores de freezing para níveis mais próximos aos dos animais não-estressados. Esse efeito foi anulado a partir do momento que os animais que passaram pelo mesmo protocolo de estresse receberam a administração de uma dose única dos agonistas 24h após a extinção ou 30 minutos antes do dia do teste de retenção da memória de extinção. Quando foi feita a administração, também ao longo de 7 dias, da mesma dose citada de um agonista PPAR α (Fenofibrato) não foi observado o mesmo efeito benéfico evidenciado pela diminuição no percentual de freezing dos animais estressados, mesmo após a extinção, como ocorreu com o agonista PPAR γ , indicando que esse efeito pode estar ocorrendo exclusivamente via ativação de receptores PPAR γ . O tratamento com os antagonistas dos dois receptores também não causou nenhum tipo de efeito na resposta de freezing dos animais.

De fato, dados da literatura que empregam o modelo de SRS corroboram com os achados nesse trabalho indicando alterações comportamentais importantes. Unyial e

colaboradores (2019) realizaram o protocolo de SRS em ratos previamente à exposição ao medo condicionado ao som (MCS) e 24h depois verificaram a capacidade de extinguir essa memória de medo condicionado ao longo de 14 dias (período de teste da extinção). Os resultados comportamentais obtidos pelos pesquisadores mostram que os animais submetidos ao SRS apresentam prejuízo na capacidade de extinção da memória de medo com a resposta de *freezing* significativamente maior nos animais estressados do que nos animais controle não estressados a partir do 9º dia até o 14º. Além disso, foram verificadas uma série de alterações comportamentais como aumento no comportamento tipo ansioso, diminuição na resposta de interação social e aumento no comportamento compulsivo no teste de marble burying (Uniyal et al., 2019). Outro estudo utilizando o modelo de condicionamento aversivo ao sabor utilizando cloreto de lítio demonstrou que os animais que foram previamente estressados e reestressados apresentaram uma maior capacidade de consolidar e reter a memória aversiva no 14º dia do protocolo após o condicionamento (Brand et al., 2008).

Ainda com relação aos parâmetros comportamentais, um estudo utilizando o mesmo protocolo de estresse aplicado no presente estudo verificou um aumento na imobilidade dos ratos estressados no teste do nado forçado (TNF), indicando um comportamento tipo-depressão, efeito ansiogênico, expresso pelo tempo dispendido e número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (LCE), e diminuição do tempo dispendido no centro do teste do campo aberto (TCA) e da distância percorrida no centro, mas não na distância total no aparato (Ji et al., 2014). Nos estudos de Garabadu, Ahmada e Krishnamurthy (2015) foi utilizado um protocolo de SRS modificado. No dia 2 do protocolo experimental foi feita a restrição dos animais por 2h, seguido de nado forçado por 20 minutos e exposição ao anestésico Halotano (4%). Seis dias depois foi realizada a re-exposição dos animais ao nado forçado ocorrendo novamente de 6 em 6 dias até o dia 32. Durante esses dias de reexposição avaliou-se parâmetros comportamentais e moleculares demonstrando que os animais estressados apresentaram

aumento do tempo de imobilidade no TNF, diminuição do número de entradas nos braços abertos no LCE, prejuízo da memória espacial no labirinto em Y e diminuição da concentração plasmática de corticosterona com relação aos animais não estressados.

Nos primeiros experimentos deste estudo referentes à padronização do modelo de SRS houve uma diminuição da distância total percorrida no teste do campo aberto (TCA) nos ratos estressados já os grupos controle que foram acondicionados em suas moradias de forma isolada ou agrupados apresentaram distâncias percorridas maiores. Realmente, esse fenômeno é compatível com outros experimentos com TCA que utilizam animais isolados e/ou agrupados (Heidbreder et al., 2000; Mora-Gallegos e Fornaguera, 2019). O mesmo padrão de alteração comportamental no TCA não foi observado nos experimentos seguintes, o que pode ter acontecido devido ao baixo número de repetições por grupo não ter sido o suficiente para evidenciar tais alterações, ou os fármacos não exercem nenhuma alteração significativa no padrão locomotor dos roedores. Ademais, as sessões de condicionamento, expressão do medo condicionado, extinção e teste empregados no modelo de condicionamento aversivo do presente trabalho manteve-se o mesmo independente da forma na qual os animais permaneceram acondicionados entrando em concordância com os resultados de outros estudos envolvendo animais socialmente isolados ou agrupados (Lukkes et al., 2009a; Lukkes et al., 2009b; Weiss et al., 2004; Mora-Gallegos e Fornaguera, 2019)

Essas alterações comportamentais ocasionadas pelo estresse guardam semelhança àquelas comumente associadas à miríade de sintomas presentes em pacientes com TEPT, como depressão, ansiedade e prejuízos na memória (American Psychiatric Association, 2013; Kirkpatrick e Heller, 2014).

Como já mencionado, neste estudo a administração de um agonista PPAR γ (Pioglitazona) por sete dias levou a uma diminuição da resposta de freezing dos ratos submetidos ao protocolo de SRS quando reexpostos ao mesmo contexto onde foram

previamente condicionados. A literatura aponta para um papel desses receptores na regulação de respostas cognitivas e de aprendizado que seguem o mesmo padrão, como no estudo de Gemma (2004) onde é demonstrado experimentalmente que ratos idosos que receberam por 2 meses uma dieta suplementada com Rosiglitazona (agonista PPAR γ) na concentração de 10 mg/kg apresentaram reversão no déficit contextual verificado em ratos idosos controle, sendo expresso pelo retorno no aumento do percentual de freezing. O mesmo fenômeno foi verificado em camundongos B6SJL de meia-idade (8 meses) que foram pré-tratados com uma estimulação intracranial que causa morte neuronal e prejuízos cognitivos relacionados à aprendizagem e memória e em seguida receberam o mesmo tipo de dieta com Rosiglitazona (30 mg/kg). Posteriormente, esses animais foram submetidos ao teste de discriminação de contexto por 6 dias seguidos. Nesses animais a resposta de freezing foi maior no contexto A (onde foram condicionados) em detrimento do contexto B (contexto neutro) ao longo de mais dias do que foi verificado nos animais controle, apontando para uma restauração da função de aprendizagem e memória anteriormente perdidas (Cortez *et al.*, 2019).

Do mesmo modo, quando ratos anestesiados receberam a administração do antagonista do receptor PPAR γ (GW9662) via i.p. seguido da administração de formalina na pata traseira, e imediatamente após submetidos ao paradigma do medo condicionado ao contexto, a resposta total de freezing (segundos) foi maior do que a do grupo controle condicionado (veículo e formalina). Animais que receberam a administração sistêmica de antagonistas PPAR α ou PPAR β/δ tiveram a resposta de freezing induzida pelo contexto potencializada sem afetar os 3 minutos iniciais de expressão da memória aversiva (Gaspar *et al.*, 2020). O mesmo efeito pôde ser constatado com a administração diretamente na amígdala basolateral do mesmo antagonista nos primeiros 3 minutos de reexposição ao contexto, enquanto que para o antagonista PPAR α foi verificada diferença com relação ao controle no minuto 10-12 apenas. Com relação ao tempo total, os grupos que receberam antagonistas PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ diferiram

significativamente dos animais controle. Os animais que não foram expostos ao condicionamento ao contexto, mas que receberam a administração dos antagonistas PPAR α ou PPAR β/δ também apresentaram um aumento na resposta de freezing, com uma tendência estatística para o grupo que recebeu antagonista PPAR γ , ao comparar com animais controle que receberam apenas veículo (Gaspar *et al.*, 2022).

A interação dos receptores PPAR com outros sistemas de neurotransmissão pode explicar parcialmente os efeitos observados neste estudo. De fato, os endocanabinóides mais comuns (Anandamida, AA, e 2-araquidonoilglicerol, 2-AG) são as principais moléculas produzidas pelas células pertencentes ao sistema endocanabinóide e que desempenham importante papel via receptores CB1 e CB2 nas respostas à neuroinflamação, dano neuronal, em doenças neurodegenerativas, além de regular de forma geral funções motoras e emocionais, homeostase intracelular e demais funções fisiológicas neurais (Iannotti *et al.*, 2016; Kasatkina, 2021; Melas *et al.*, 2021; Pertwee, 2008; Tsuboi *et al.*, 2018). Outros compostos também se relacionam com esse sistema, como os derivados de N-aciletanolamina (PEA, AEA e etc.) que possuem atividade canabinomimética e podem modular a ação e atividade do sistema endocanabinóide por diversas vias, como os GPRs (receptores acoplados à proteína G não canabinóide), TRPV (receptores de potencial transiente do tipo vanilóide) e através dos receptores PPARs (Ambrosino, 2013; Iannotti *et al.*, 2016; Karwad *et al.*, 2019; Kasatkina, 2021; Melas *et al.*, 2021; Panchal *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2022; Tsuboi *et al.*, 2018).

Alguns estudos vêm elencando o papel regulatório cruzado entre os efeitos observados pela ativação do sistema endocanabinóide e os receptores PPAR em diversos órgãos e tecidos. Em um deles os autores mostraram que a administração do antagonista PPAR γ 10 minutos após injeção de canabidiol (CBD), agonista parcial/antagonista CB1 e antagonista CB2, ambos diretamente no hipocampo dorsal, 1h após a sessão de consolidação da memória de medo condicionado ao contexto foi capaz de reverter o prejuízo causado pelo CBD na consolidação

dessa memória, indicando um papel dos receptores PPAR γ na formação de memórias aversivas (Raymundi et al., 2020). Em um outro estudo, células astrocíticas FAAH-Knockout (do inglês *fatty acid amide hydrolase*, enzima responsável por hidrolisar a anandamida) exibiram fenótipo pró-inflamatório quando expostas ao peptídeo β -amilóide, tendo a ausência da enzima aumentado a taxa de morte celular e de produção de citocinas, aumento no tempo de ativação de vias de sinalização específicas e da expressão de mediadores inflamatórios em astrócitos. Quando essas células foram pré-incubadas com N-aciletanolaminas ocorreu uma prevenção do aumento da expressão de marcadores pró-inflamatórios induzidos pelo peptídeo. Além disso, os dados mostram que bloqueio dos receptores CB1 e CB2 não foram capazes de diminuir a expressão dos mesmos marcadores pró-inflamatórios. Contudo, essas mesmas células Knockout exibiram um padrão de diminuição da expressão de receptores PPAR α e PPAR γ , e a ativação desses receptores por agonistas promoveu a redução dos efeitos pró-inflamatórios ocasionados pelo peptídeo A β sem afetar seus níveis de expressão. Por outro lado, nessas células houve um aumento da expressão do mRNA de TRPV1, e tratamento com capsaicina (agonista TRPV1) promoveu diminuição da expressão do mRNA de COX-2, TNF- α e iNOS (Benito et al., 2012). Semelhantemente, a molécula lipídica PEA, agonista endógeno dos receptores PPAR α , foi capaz de aumentar o influxo de cálcio via receptores TRPV1 em uma cultura de células sensoriais periféricas, efeito que foi bloqueado com a concomitante administração de GW6471. Esse fenômeno parece ocorrer independente de regulação da expressão gênica e mediado via receptores PPAR α , apontando para uma relação entre os receptores TRPV e PPAR (Ambrosino et al., 2013).

O endocanabinóide 2-AG aparenta guardar relação com os receptores PPAR ao suprimir a fosforilação do complexo NF- κ B-p65 e expressão de COX-2, ocasionados pela presença das moléculas IL-1 β e LPS, em cultura de células hipocâmpais via ativação direta do receptor PPAR γ . Esse efeito anti-inflamatório e neuroprotetor ocorreu após indução do aumento da

concentração de 2-AG de forma exógena (administrando diretamente no meio) e endógena (ao inibir a degradação pela enzima lipase de monoacilglicerol, MAGL). Ao inibir os receptores CB1 farmacologicamente e por deleção genética, esse efeito foi completamente abolido, indicando que o efeito via PPAR γ ocorre mediante ativação ou interação com os receptores do tipo CB1 (Du et al., 2011). Contudo, outro estudo demonstrou que a supressão da expressão de IL-2 é mediada por uma via independente de receptores CB1/2 que envolve a ativação dos receptores PPAR γ . Dessa forma, sugere-se que o endocanabinóide pode ativar diretamente o receptor PPAR γ cruzando o plasma e outras barreiras membranosas celulares (Du et al., 2011; O'Sullivan, 2007; O'Sullivan e Kendal, 2010; Pistis e Melis, 2010; Sun et al., 2007). Com isso, fica clara a existência de uma possível interação entre os receptores PPAR e o sistema endocanabinóide, apesar de ainda possuir resultados um tanto quanto conflituosos e nebulosos, lançando luz a novos possíveis mecanismos de ação para essa família de receptores nucleares modularem o comportamento e demais funções realizadas pelo SNC.

Do mesmo modo, um estudo que evidencia a participação desse receptor na regulação do eixo HPA pode ser atestado em camundongos tratados com N-acetilcisteína, substância capaz de causar hipertrofia da medula adrenal e aumento na circulação de glicocorticóides por meio de um mecanismo que envolve aumento na expressão de receptores MC2R (receptor melanocortina 2, para o ACTH) e StAR (proteína reguladora aguda da estereidogênese) nesse órgão. Nesse modelo, animais tratados com Rosiglitazona apresentaram remissão dos efeitos de hipercorticoidismo e de hipertrofia do órgão periférico (Ventura et al., 2020). O mesmo fármaco também foi capaz de produzir os mesmos efeitos anteriormente citados associado à diminuição de receptores para ACTH nas glândulas adrenais de ratos diabéticos. Outrossim, essa redução também está associada com a diminuição de células ACTH positivas presentes na hipófise anterior, da produção de POMC (pró-opiomelanocortina) e ACTH. Por outro lado, foi verificado um aumento na presença de células positivas para PPAR γ e da expressão de PI3K

tanto na glândula adrenal quanto na pituitária. Esses achados apontam para uma relação da presença de receptores PPAR γ e uma diminuição da hiperatividade ou hipersensibilidade do eixo HPA frente a uma situação estressora (Torres et al., 2016).

O estresse pode desencadear uma resposta pró-inflamatória com a produção de mediadores inflamatórios por diferentes tipos celulares, incluindo as células neuronais e da glia, a partir da liberação de catecolaminas ou até mesmo de hormônios locais (Bierhaus et al., 2003; Galic *et al.*, 2012; Fleshner *et al.*, 2017). A partir disso, essas moléculas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α produzidas pelas células do SNC podem atuar em diferentes etapas dos processos de formação da memória, a saber consolidação, extinção e evocação (incluindo a memória aversiva) (Pugh et al., 1999; Hao *et al.*, 2014; Jing *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2017). Nesse cenário, os receptores PPAR exercem importante função na regulação da neuroinflamação. Os receptores PPAR α estão intimamente associados à inibição do NF- κ B, fator esse responsável pela expressão e transcrição de inúmeras moléculas pró-inflamatórias, impactando de forma benéfica inúmeros modelos de neurodegeneração. A ativação do PPAR α também é capaz de inibir a atividade da AP-1 e diminuir a expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM -1) que estão associadas a processos inflamatórios em geral. Além disso, quando o PPAR α é ativado moléculas como IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α , ciclo-oxigenase tipo 2 (COX-2), endotelina tipo 1 e óxido nítrico síntase indutiva (iNOS) estão reduzidas (Colville-Nash et al., 1998; Cunard et al., 2002; Grau et al., 2006; Paterniti et al., 2013; Zolezzi et al., 2017). O receptor PPAR γ aparenta agir pelos mesmos mecanismos que a isoforma α no que tange a regulação dos processos de neuroinflamação, sendo responsável por inibir e diminuir a produção e expressão de moléculas pró-inflamatórias incluindo NF- κ B, AP-1, ICAM-1, STAT-1 (tradutor de sinal ativador de transcrição) (Moraes et al., 2006, Skerret et al., 2014; Wójtowicz et al., 2020; Zolezzi et al., 2017)

Considerando os inúmeros papéis dos receptores PPAR na regulação de diferentes vias de sinalização e funções celulares relacionadas com comportamento, emoções, cognição, processos fundamentais da célula, neuroinflamação, metabolismo de lipídeos (Locci e Pinna, 2019; Mirza *et al.*, 2019; Towfighi e Oybiagele, 2008), dentre outros, é completamente aberto à especulações neurofisiológicas os possíveis mecanismos pelo qual ocorreu a reversão do déficit na extinção da memória de medo condicionada ao contexto causada pela administração sub-crônica de um agonista PPAR γ . Por outro lado, parece que o receptor PPAR α não está relacionado com essa etapa de formação da memória nas condições de estresse pré-estabelecidas aos animais. Esse fenômeno é curioso, visto que na literatura é muito mencionado e documentado o papel benéfico desse último receptor em modelos de neurodegeneração e até mesmo em estudos que relacionam processos mais subjetivos voltados para emoções, cognição, memória e aprendizado (Locci e Pinna, 2019; Nisbet e Pinna, 2018; Wójtowicz *et al.*, 2020)

Em resumo, o receptor PPAR γ , mas não o PPAR α , foi capaz de reverter o prejuízo na capacidade de extinção de ratos submetidos ao protocolo de SRS quando administrado sistemicamente de forma sub-crônica (ao longo de 7 dias).

6. Conclusão

O presente estudo foi capaz de demonstrar experimentalmente que a administração de Pioglitazona, fármaco agonista do receptor PPAR γ , ao longo de 7 dias na dose de 10 mg/kg foi capaz de reverter o efeito deletério do estresse, representado como a diminuição no percentual de freezing do animal a níveis semelhantes aos animais que não passaram por nenhum evento estressor, no processo de extinção da memória aversiva em um modelo animal de transtorno do estresse pós-traumático. Entretanto, esse efeito é completamente revertido ao administrar apenas uma dose do mesmo fármaco 24h depois da sessão de extinção da memória aversiva ou 30 minutos antes do teste de extinção, apontando para a necessidade de uma ativação crônica e continuada do receptor a fim de que o efeito benéfico seja sustentado.

Além disso, o fármaco não foi capaz de causar efeitos tipo-ansiógênicos, dentro das limitações implícitas ao modelo de teste do campo aberto, nem qualquer tipo de alteração locomotora nos animais. Vale ressaltar que os antagonistas também não apresentaram efeito algum no modelo empregado nesse estudo.

7. Referências Bibliográficas

AHMED, H. et al. Long-term clinical outcomes in survivors of severe acute respiratory syndrome and Middle East respiratory syndrome coronavirus outbreaks after hospitalisation or ICU admission: A systematic review and meta-analysis. **Journal of rehabilitation medicine: official journal of the UEMS European Board of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 52, n. 5, p. jrm00063, 2020.

ALBERINI, C. M.; LEDOUX, J. E. Memory reconsolidation. **Current biology: CB**, v. 23, n. 17, p. R746–R750, 2013.

ALVARENGA, M. A. S.; FLORES-MENDOZA, C. E.; GONTIJO, D. F. Evolução do DSM quanto ao critério categorial de diagnóstico para o distúrbio da personalidade antissocial. **Jornal brasileiro de psiquiatria**, v. 58, n. 4, p. 258–266, 2009.

AMBROSINO, P. et al. Activation and desensitization of TRPV1 channels in sensory neurons by the PPAR α agonist palmitoylethanolamide: PPAR α - and TRPV1-dependent [Ca²⁺]_i increase by PEA in neurons. **British journal of pharmacology**, v. 168, n. 6, p. 1430–1444, 2013.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5 (R))**. 5. ed. Arlington, TX, USA: American Psychiatric Association Publishing, 2013.

ANDREASEN, N. C. What is post-traumatic stress disorder? **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 240–243, 2011.

BECK, C. H.; FIBIGER, H. C. Chronic desipramine alters stress-induced behaviors and regional expression of the immediate early gene, c-fos. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 51, n. 2–3, p. 331–338, 1995a.

BECK, C. H.; FIBIGER, H. C. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 709–720, 1995b.

BELZUNG, C. **Handbook of Molecular Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences)**. Amsterdam: Elsevier, 1999.

BEN-EZRA, M. Trauma 4,000 years ago? **The American journal of psychiatry**, v. 159, n. 8, p. 1437–1437, 2002.

BENITO, C. et al. β -Amyloid exacerbates inflammation in astrocytes lacking fatty acid amide hydrolase through a mechanism involving PPAR- α , PPAR- γ and TRPV1, but not CB₁ or CB₂ receptors: Beta amyloid and FAAH-KO astrocytes. **British journal of pharmacology**, v. 166, n. 4, p. 1474–1489, 2012.

BETTERIDGE, D. J. Thiazolidinediones and fracture risk in patients with Type 2 diabetes: Thiazolidinediones and bone fractures. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 28, n. 7, p. 759–771, 2011.

BIERHAUS, A. et al. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 4, p. 1920–1925, 2003.

BISAZ, R.; TRAVAGLIA, A.; ALBERINI, C. M. The neurobiological bases of memory formation: from physiological conditions to psychopathology. **Psychopathology**, v. 47, n. 6, p. 347–356, 2014.

BRAND, L. et al. Stress and re-stress increases conditioned taste aversion learning in rats: possible frontal cortical and hippocampal muscarinic receptor involvement. **European journal of pharmacology**, v. 586, n. 1–3, p. 205–211, 2008.

BRUENIG, D. et al. Genetic and serum biomarker evidence for a relationship between TNF α and PTSD in Vietnam war combat veterans. **Comprehensive psychiatry**, v. 74, p. 125–133, 2017.

BUTOVSKY, O.; WEINER, H. L. Microglial signatures and their role in health and disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 622–635, 2018.

CAI, W. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): A master gatekeeper in CNS injury and repair. **Progress in neurobiology**, v. 163–164, p. 27–58, 2018.

CÂMARA FILHO, J. W. S.; SOUGEY, E. B. Transtorno de estresse pós-traumático: formulação diagnóstica e questões sobre comorbidade. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil: 1999)**, v. 23, n. 4, p. 221–228, 2001.

CHAMAA, F. et al. Abou-Kheir W. PTSD in the COVID-19 Era. **Curr Neuropharmacol**, v. 19, n. 12, p. 2164–2179, 2021.

CHIANG, M. C. et al. Rosiglitazone activation of PPAR α -dependent signaling is neuroprotective in mutant huntingtin expressing cells. **Exp Cell Res**, v. 338, p. 183–193, 2015.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 267, n. 9, p. 1244–1252, 1992.

COLVILLE-NASH, P. R. et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. **The journal of immunology**, v. 161, n. 2, p. 978–984, 1998.

CORTEZ, I.; DENNER, L.; DINELEY, K. T. Divergent mechanisms for PPAR γ agonism in ameliorating aging-related versus cranial irradiation-induced context discrimination deficits. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 11, p. 38, 2019.

CRAWFORD, L.; LOPRINZI, P. D. Effects of exercise on memory interference in neuropsychiatric disorders. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1228, p. 425–438, 2020.

CUNARD, R. et al. WY14,643, a PPAR alpha ligand, has profound effects on immune responses in vivo. **The journal of immunology**, v. 169, n. 12, p. 6806–6812, 2002a.

CUNARD, R. et al. Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. **The journal of immunology**, v. 168, n. 6, p. 2795–2802, 2002b.

D'ANGELO, M. et al. PPAR γ and cognitive performance. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 20, p. 5068, 2019.

DAVIDSON, M. A. et al. Thiazolidinedione drugs in the treatment of type 2 diabetes mellitus: past, present and future. **Critical reviews in toxicology**, v. 48, n. 1, p. 52–108, 2018.

DE QUERVAIN, D.; SCHWABE, L.; ROOZENDAAL, B. Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 7–19, 2017.

DOMI, E. et al. Genetic deletion of neuronal PPAR γ enhances the emotional response to acute stress and exacerbates anxiety: An effect reversed by rescue of amygdala PPAR γ function. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 36, n. 50, p. 12611–12623, 2016.

DU, H. et al. Inhibition of COX-2 expression by endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is mediated via PPAR- γ : PPAR γ in 2-AG suppression of COX-2. **British journal of pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1533–1549, 2011.

DUBEY, S. et al. Psychosocial impact of COVID-19. **Diabetes & metabolic syndrome**, v. 14, n. 5, p. 779–788, 2020.

DUNN, A. J.; BERRIDGE, C. W. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? **Brain research. Brain research reviews**, v. 15, n. 2, p. 71–100, 1990.

ELSEY, J. W. B.; VAN AST, V. A.; KINDT, M. Human memory reconsolidation: A guiding framework and critical review of the evidence. **Psychological bulletin**, v. 144, n. 8, p. 797–848, 2018.

Enhanced suppression of cortisol following dexamethasone administration in posttraumatic stress disorder. **The American journal of psychiatry**, v. 150, n. 1, p. 83–86, 1993.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 23, n. 5, p. 743–760, 1999.

FLESHNER, M.; FRANK, M.; MAIER, S. F. Danger signals and inflammasomes: Stress-evoked sterile inflammation in mood disorders. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 36–45, 2017.

FRANK, F.; ORTLUND, E. A.; LIU, X. Structural insights into glucocorticoid receptor function. **Biochemical Society transactions**, v. 49, n. 5, p. 2333–2343, 2021.

GALIC, M. A.; RIAZI, K.; PITTMAN, Q. J. Cytokines and brain excitability. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 33, n. 1, p. 116–125, 2012.

GARABADU, D.; AHMAD, A.; KRISHNAMURTHY, S. Risperidone attenuates modified stress-re-stress paradigm-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in rats exhibiting post-traumatic stress disorder-like symptoms. **Journal of molecular neuroscience: MN**, v. 56, n. 2, p. 299–312, 2015.

GASPAR, J. C. et al. Effects of intra-BLA administration of PPAR antagonists on formalin-evoked nociceptive behaviour, fear-conditioned analgesia, and conditioned fear in the presence or absence of nociceptive tone in rats. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 6, p. 2021, 2022.

GEMMA, C. et al. Rosiglitazone improves contextual fear conditioning in aged rats. **Neuroreport**, v. 15, n. 14, p. 2255–2259, 2004.

GENE-COS, N. Post-traumatic stress disorder: The management of PTSD in adults and children in primary and secondary care. National collaborating centre for mental health. London & Leicester: Gaskell & the British psychological society, 2005, £50.00, pp.168 ISBN: 190467125. **Psychiatric bulletin (London, England)**, v. 30, n. 9, p. 357–357, 2006.

GIUSTINO, T. F.; MAREN, S. The role of the medial prefrontal cortex in the conditioning and extinction of fear. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 9, 2015.

GRAU, R. et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor alpha agonists inhibit cyclooxygenase 2 and vascular endothelial growth factor transcriptional activation in human colorectal carcinoma cells via inhibition of activator protein-1. **The Biochemical journal**, v. 395, n. 1, p. 81–88, 2006.

HAO, Y. et al. Intra-amygdala microinfusion of IL-6 impairs the auditory fear conditioning of rats via JAK/STAT activation. **Behavioural brain research**, v. 275, p. 88–95, 2014.

HARNETT, N. G.; GOODMAN, A. M.; KNIGHT, D. C. PTSD-related neuroimaging abnormalities in brain function, structure, and biochemistry. **Experimental neurology**, v. 330, n. 113331, p. 113331, 2020.

HARVEY, B. H. et al. Cortical/hippocampal monoamines, HPA-axis changes and aversive behavior following stress and restress in an animal model of post-traumatic stress disorder. **Physiology & behavior**, v. 87, n. 5, p. 881–890, 2006.

HEIDBREDE, C. A. et al. Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. **Neuroscience**, v. 100, n. 4, p. 749–768, 2000.

Henrique IV (parte I) - William Shakespeare. Disponível em: <<http://www.ebooksbrasil.org/eLibris/henry4.html>>. Acesso em: 12 may. 2023.

HOLMES, F. L. Claude Bernard, The “Milieu Intérieur”, and Regulatory Physiology. **History and philosophy of the life sciences**, v. 8, n. 1, p. 3–25, 1986.

Homer, The Iliad, Scroll 18, line 97. Disponível em:
<<http://data.perseus.org/citations/urn:cts:greekLit:tlg0012.tlg001.perseus-eng2:18.97->>.

Acesso em: 12 may. 2023.

HORI, H.; KIM, Y. Inflammation and post-traumatic stress disorder. **Psychiatry and clinical neurosciences**, v. 73, n. 4, p. 143–153, 2019.

HOSKINS, M. et al. Pharmacotherapy for post-traumatic stress disorder: Systematic review and meta-analysis. **The British journal of psychiatry: the journal of mental science**, v. 206, n. 2, p. 93–100, 2015.

HUANG, D. et al. PPAR- α agonist WY-14643 inhibits LPS-induced inflammation in synovial fibroblasts via NF-kB pathway. **Journal of molecular neuroscience: MN**, v. 59, n. 4, p. 544–553, 2016.

HUANG, H.-T. et al. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha promote glutamate transporter-1 endocytosis in astrocytes. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 86, p. 42–53, 2017.

IANNOTTI, F. A.; DI MARZO, V.; PETROSINO, S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. **Progress in lipid research**, v. 62, p. 107–128, 2016.

IZQUIERDO, I. **Memória - 3.ed.** [s.l.] Artmed Editora, 2018.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C. Fear memory. **Physiological reviews**, v. 96, n. 2, p. 695–750, 2016.

JACKSON, M. Evaluating the Role of Hans Selye in the Modern History of Stress. In: CANTOR, D.; RAMSDEN, E. (Eds.). **Stress, Shock, and Adaptation in the Twentieth Century**. Rochester (NY: University of Rochester Press, 2014.

JI, L.-L. et al. Intra-hippocampal administration of ZIP alleviates depressive and anxiety-like responses in an animal model of posttraumatic stress disorder. **Behavioral and brain functions: BBF**, v. 10, n. 1, p. 28, 2014.

JING, H. et al. Intra-amygdala microinjection of TNF- α impairs the auditory fear conditioning of rats via glutamate toxicity. **Neuroscience research**, v. 91, p. 34–40, 2015.

JOELS, M. et al. This influential opinion paper laid the theoretical basis for a number of studies on timing. **Trends Cogn. Sci**, v. 10, p. 152–158, 2006.

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 459–466, 2009.

JOHANSEN, J. P. et al. Molecular mechanisms of fear learning and memory. **Cell**, v. 147, n. 3, p. 509–524, 2011.

JOSEPH, D.; WHIRLEDGE, S. Stress and the HPA axis: Balancing homeostasis and fertility. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 10, p. 2224, 2017.

KADMIEL, M.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends in pharmacological sciences**, v. 34, n. 9, p. 518–530, 2013.

KARWAD, M. A. et al. Endocannabinoids and endocannabinoid-like compounds modulate hypoxia-induced permeability in CaCo-2 cells via CB1, TRPV1, and PPAR α . **Biochemical pharmacology**, v. 168, p. 465–472, 2019.

KASATKINA, L. A.; RITTCHEN, S.; STURM, E. M. Neuroprotective and immunomodulatory action of the endocannabinoid system under neuroinflammation. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 11, p. 5431, 2021.

KIDA, S. Reconsolidation/destabilization, extinction and forgetting of fear memory as therapeutic targets for PTSD. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 1, p. 49–57, 2019.

KIRKPATRICK, H. A.; HELLER, G. M. Post-traumatic stress disorder: theory and treatment update. **International journal of psychiatry in medicine**, v. 47, n. 4, p. 337–346, 2014.

KLIER, C.; BURATTO, L. G. Stress and long-term memory retrieval: a systematic review. **Trends in psychiatry and psychotherapy**, v. 42, n. 3, p. 284–291, 2020.

KOHDA, K. et al. Glucocorticoid receptor activation is involved in producing abnormal phenotypes of single-prolonged stress rats: a putative post-traumatic stress disorder model. **Neuroscience**, v. 148, n. 1, p. 22–33, 2007.

KRAMER, S. N. Ancient near eastern texts: Relating to the Old Testament. p. 455–463, 1969.

KUCMIN, T. et al. History of trauma and posttraumatic disorders in literature. **Psychiatria polska**, v. 50, n. 1, p. 269–281, 2016.

LEDOUX, J. E. Brain mechanisms of emotion and emotional learning. **Current opinion in neurobiology**, v. 2, n. 2, p. 191–197, 1992.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 155–184, 2000.

LEDOUX, J. E. Coming to terms with fear. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 8, p. 2871–2878, 2014.

LEDOUX, J. E.; BROWN, R. A higher-order theory of emotional consciousness. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 10, p. E2016–E2025, 2017.

LEE, D. J. et al. Psychotherapy versus pharmacotherapy for posttraumatic stress disorder: Systemic review and meta-analyses to determine first-line treatments. **Depression and anxiety**, v. 33, n. 9, p. 792–806, 2016.

LIBERZON, I.; KRSTOV, M.; YOUNG, E. A. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. **Psychoneuroendocrinology**, v. 22, n. 6, p. 443–453, 1997.

LISBOA, S. F. et al. Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 9, p. 1163–1173, 2010.

LOCCI, A. et al. Social isolation in early versus late adolescent mice is associated with persistent behavioral deficits that can be improved by neurosteroid-based treatment. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 11, p. 208, 2017.

LOCCI, A.; PINNA, G. Stimulation of peroxisome proliferator-activated receptor- α by N-palmitoylethanolamine engages allopregnanolone biosynthesis to modulate emotional behavior. **Biological psychiatry**, v. 85, n. 12, p. 1036–1045, 2019.

LU, S.; WEI, F.; LI, G. The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system. **Cell stress**, v. 5, n. 6, p. 76–85, 2021.

LUKKES, J. L. et al. Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. **Hormones and behavior**, v. 55, n. 1, p. 248–256, 2009a.

LUKKES, J. L. et al. Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 3, p. 18, 2009b.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annual review of neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 897–931, 2001.

MARVALDI, M. et al. Anxiety, depression, trauma-related, and sleep disorders among healthcare workers during the COVID-19 pandemic: A systematic review and meta-analysis. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 126, p. 252–264, 2021.

MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. **Physiological reviews**, v. 87, n. 3, p. 873–904, 2007.

MCGAUGH, J. L. **Memory and Emotion. The Making of Lasting Memories.** [s.l.] Weidenfeld and Nicolson, 2003.

MCKEAGE, K.; KEATING, G. M. Fenofibrate: a review of its use in dyslipidaemia: A Review of its Use in Dyslipidaemia. **Drugs**, v. 71, n. 14, p. 1917–1946, 2011.

MELAS, P. A. et al. Cannabidiol as a potential treatment for anxiety and mood disorders: Molecular targets and epigenetic insights from preclinical research. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 4, p. 1863, 2021.

MILLER, W. L. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: A brief history. **Hormone research in paediatrics**, v. 89, n. 4, p. 212–223, 2018.

MIRZA, A. Z.; ALTHAGAFI, I. I.; SHAMSHAD, H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. **European journal of medicinal chemistry**, v. 166, p. 502–513, 2019.

MONSALVE, F. A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases. **Mediators of inflammation**, v. 2013, p. 549627, 2013.

MORAES, L. A.; PIQUERAS, L.; BISHOP-BAILEY, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. **Pharmacology & therapeutics**, v. 110, n. 3, p. 371–385, 2006.

MORA-GALLEGOS, A.; FORNAGUERA, J. The effects of environmental enrichment and social isolation and their reversion on anxiety and fear conditioning. **Behavioural processes**, v. 158, p. 59–69, 2019.

MORENO, S.; FARIOLI-VECCHIOLI, S.; CERÙ, M. P. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid x receptors in the adult rat CNS. **Neuroscience**, v. 123, n. 1, p. 131–145, 2004.

NISBETT, K. E.; PINNA, G. Emerging therapeutic role of PPAR- α in cognition and emotions. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 998, 2018.

NORTH, C. S. et al. The evolution of PTSD criteria across editions of DSM. **Annals of clinical psychiatry: official journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists**, v. 28, n. 3, p. 197–208, 2016.

OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. **The journal of biological chemistry**, v. 286, n. 5, p. 3177–3184, 2011.

O'SULLIVAN, S. E. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors: Cannabinoids and PPARs. **British journal of pharmacology**, v. 152, n. 5, p. 576–582, 2007.

O'SULLIVAN, S. E.; KENDALL, D. A. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease. **Immunobiology**, v. 215, n. 8, p. 611–616, 2010.

OVERMAN, R. A.; YEH, J.-Y.; DEAL, C. L. Prevalence of oral glucocorticoid usage in the United States: a general population perspective. **Arthritis care & research**, v. 65, n. 2, p. 294–298, 2013.

PANCHAL, S.; BLISS, E.; BROWN, L. Capsaicin in Metabolic Syndrome. **Nutrients**, v. 10, n. 5, p. 630, 2018.

PASSOS, I. C. et al. Inflammatory markers in post-traumatic stress disorder: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. **The lancet. Psychiatry**, v. 2, n. 11, p. 1002–1012, 2015.

PATERNITI, I. et al. Molecular evidence for the involvement of PPAR- δ and PPAR- γ in anti-inflammatory and neuroprotective activities of palmitoylethanolamide after spinal cord trauma. **Journal of neuroinflammation**, v. 10, n. 1, p. 20, 2013.

PEDERSEN, W. A. et al. Rosiglitazone attenuates learning and memory deficits in Tg2576 Alzheimer mice. **Experimental neurology**, v. 199, n. 2, p. 265–273, 2006.

PENG, J. et al. A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 130, n. 4, p. 439–456, 2022.

PERTWEE, R. G. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin: Δ 9-THC, CBD and Δ 9-THCV. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 199–215, 2008.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral neuroscience**, v. 106, n. 2, p. 274–285, 1992.

PISTIS, M.; MELIS, M. From surface to nuclear receptors: The endocannabinoid family extends its assets. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 14, p. 1450–1467, 2010.

PITMAN, R. K. et al. Biological studies of post-traumatic stress disorder. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 13, n. 11, p. 769–787, 2012.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

PUDDIFOOT, C. et al. PGC-1 α negatively regulates extrasynaptic NMDAR activity and excitotoxicity. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 32, n. 20, p. 6995–7000, 2012.

PUGH, C. Role of interleukin-1 beta in impairment of contextual fear conditioning caused by social isolation. **Behavioural brain research**, v. 106, n. 1–2, p. 109–118, 1999.

RABER, J. et al. Current understanding of fear learning and memory in humans and animal models and the value of a linguistic approach for analyzing fear learning and memory in humans. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 105, p. 136–177, 2019.

RAYMUNDI, A. M. et al. A time-dependent contribution of hippocampal CB1 , CB2 and PPAR γ receptors to cannabidiol-induced disruption of fear memory consolidation. **British journal of pharmacology**, v. 177, n. 4, p. 945–957, 2020.

ROOZENDAAL, B.; MCEWEN, B. S.; CHATTARJI, S. Stress, memory and the amygdala. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 423–433, 2009.

ROSA, J. et al. Fear extinction can be made state-dependent on peripheral epinephrine: role of norepinephrine in the nucleus tractus solitarius. **Neurobiology of learning and memory**, v. 113, p. 55–61, 2014.

ROY, A. et al. Regulation of cyclic AMP response element binding and hippocampal plasticity-related genes by peroxisome proliferator-activated receptor α . **Cell reports**, v. 4, n. 4, p. 724–737, 2013.

SANTOMAURO, D. F.; HERRERA, A. M. M.; SHADID, J. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. **Lancet**, v. 398, p. 1700–1712, 2021.

SBARDELLOTO, G. et al. Transtorno de estresse pós-traumático: evolução dos critérios diagnósticos e prevalência. **Psico-USF**, v. 16, n. 1, p. 67–73, 2011.

SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. **BMJ**, v. 1, n. 4667, p. 1383–1392, 1950.

SELYE, H. Stress: Its relationship to man and his environment. **Ekistics; reviews on the problems and science of human settlements**, v. 55, n. 331/332, p. 162–167, 1988.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **The journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 10, n. 2, p. 230a–2231, 1998.

SHI, W. et al. Different synaptic plasticity after physiological and psychological stress in the anterior insular cortex in an observational fear mouse model. **Frontiers in synaptic neuroscience**, v. 14, 2022.

SHIN, L. M. et al. Resting metabolic activity in the cingulate cortex and vulnerability to posttraumatic stress disorder. **Archives of general psychiatry**, v. 66, n. 10, p. 1099, 2009.

SHIN, L. M.; RAUCH, S. L.; PITMAN, R. K. Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1071, n. 1, p. 67–79, 2006.

SHIRVANI, H. et al. Swimming exercise improves gene expression of PPAR- γ and downregulates the overexpression of TLR4, MyD88, IL-6, and TNF- α after high-fat diet in rat skeletal muscle cells. **Gene**, v. 775, n. 145441, p. 145441, 2021.

SKERRETT, R.; MALM, T.; LANDRETH, G. Nuclear receptors in neurodegenerative diseases. **Neurobiology of disease**, v. 72 Pt A, p. 104–116, 2014.

SMITH, M. A. et al. Induction of c-fos mRNA in rat brain by conditioned and unconditioned stressors. **Brain research**, v. 578, n. 1–2, p. 135–141, 1992.

SOTRES-BAYON, F.; CAIN, C. K.; LEDOUX, J. E. Brain mechanisms of fear extinction: historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex. **Biological psychiatry**, v. 60, n. 4, p. 329–336, 2006.

SPARTA, D. R. et al. Inhibition of projections from the basolateral amygdala to the entorhinal cortex disrupts the acquisition of contextual fear. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, 2014.

SUN, L. et al. **Prevalence and Risk Factors of Acute Posttraumatic Stress Symptoms during the COVID19 Outbreak in Wuhan**. [s.l.: s.n.].

SUN, Y. et al. Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism. **British journal of pharmacology**, v. 152, n. 5, p. 734–743, 2007.

SZABO, S. et al. “stress” is 80 years old: From Hans Selye original paper in 1936 to recent advances in GI ulceration. **Current pharmaceutical design**, v. 23, n. 27, 2017.

TAKAKI, J. et al. L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the “collusion” hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. **Journal of neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 275, 2012.

TER HEEGDE, F.; DE RIJK, R. H.; VINKERS, C. H. The brain mineralocorticoid receptor and stress resilience. **Psychoneuroendocrinology**, v. 52, p. 92–110, 2015.

TORRES, R. C. et al. Activation of PPAR- γ reduces HPA axis activity in diabetic rats by up-regulating PI3K expression. **Experimental and molecular pathology**, v. 101, n. 2, p. 290–301, 2016.

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

TOWFIGHI, A.; OVBIAGELE, B. Partial peroxisome proliferator-activated receptor agonist angiotensin receptor blockers. **Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 2, p. 106–112, 2008.

TSUBOI, K. et al. Endocannabinoids and related N-acylethanolamines: biological activities and metabolism. **Inflammation and regeneration**, v. 38, n. 1, p. 28, 2018.

ULIANA, D. L. et al. Dorsolateral periaqueductal gray matter CB1 and TRPV1 receptors exert opposite modulation on expression of contextual fear conditioning. **Neuropharmacology**, v. 103, p. 257–269, 2016.

UNIYAL, A. et al. Co-treatment of piracetam with risperidone rescued extinction deficits in experimental paradigms of post-traumatic stress disorder by restoring the physiological alterations in cortex and hippocampus. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 185, n. 172763, p. 172763, 2019.

VANCE, M. C.; HOWELL, J. D. Shell shock and PTSD: A tale of two diagnoses. **Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic**, v. 95, n. 9, p. 1827–1830, 2020.

VENTURA, R. D. et al. Activation of PPAR γ reduces N-acetyl-cysteine -induced hypercorticism by down-regulating MC2R expression into adrenal glands. **Free radical biology & medicine**, v. 156, p. 137–143, 2020.

WANG, Y.; WANG, H. Impact of COVID-19 pandemic on the mental health of scientists. **Innovation (Cambridge (Mass.))**, v. 4, n. 2, p. 100400, 2023.

WARDEN, A. et al. Localization of PPAR isotypes in the adult mouse and human brain. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, 2016.

WEISS, I. C. et al. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. **Behavioural brain research**, v. 152, n. 2, p. 279–295, 2004.

WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 12 may. 2023.

WOOLF, Virginia. **Mrs. Dalloway**. Tradução de Mário Quintana. 12^a Reimpressão. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1980.

WÓJTOWICZ, S. et al. The novel role of PPAR alpha in the brain: Promising target in therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. **Neurochemical research**, v. 45, n. 5, p. 972–988, 2020.

YEHUDA, R. et al. Low urinary cortisol excretion in patients with posttraumatic stress disorder. **The journal of nervous and mental disease**, v. 178, n. 6, p. 366–369, 1990.

YEHUDA, R. et al. Low cortisol and risk for PTSD in adult offspring of holocaust survivors. **The American journal of psychiatry**, v. 157, n. 8, p. 1252–1259, 2000.

YEHUDA, R. Post-traumatic stress disorder. **The New England journal of medicine**, v. 346, n. 2, p. 108–114, 2002.

YEHUDA, R.; ANTELMAN, S. M. Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. **Biological psychiatry**, v. 33, n. 7, p. 479–486, 1993.

YOO, S. H.; ABDELMEGEED, M. A.; SONG, B.-J. Activation of PPAR α by Wy-14643 ameliorates systemic lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 436, n. 3, p. 366–371, 2013.

YU, Z. et al. Microglial production of TNF-alpha is a key element of sustained fear memory. **Brain, behavior, and immunity**, v. 59, p. 313–321, 2017.

ZAKROCKA, I. et al. Gemfibrozil decreases kynurenic acid production in rat brain in vitro. **Folia Neuropathol**, v. 56, n. 3, p. 273–274, 2018.

ZHAO, J. et al. Expression of TNF- α and IL- β can be suppressed via the PPAR- γ /mTOR signaling pathway in BV-2 microglia: A potential anti-inflammation mechanism. **Molecular medicine reports**, 2020.

ZHAO, X. et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) activation protects neurons from NMDA excitotoxicity. **Brain research**, v. 1073–1074, p. 460–469, 2006.

ZOLEZZI, J. M. et al. PPARs in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroinflammation: PPARs in the CNS and neurodegenerative diseases. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 92, n. 4, p. 2046–2069, 2017.

ANEXO A



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



A U T O R I Z A Ç Ã O

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: *“Efeito da administração sub-crônica de Pioglitazona e Fenofibrato na produção de citocinas e expressão de receptores glutamatérgicos em um modelo de Transtorno do Estresse Pós-Traumático”*, registrado com o número do protocolo **117/2021**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *fillo Chordata, subfillo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 29 de novembro de 2021.

Colaboradora: Antonio Furtado da Silva Júnior
Andreza Buzolin Sonogo

Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	29/11/2021 a 01/03/2022
Espécie/Linhagem	Rato / Wistar-OLD
Nº de animais	540
Peso/Idade	280g / 70 dias
Sexo	Macho
Origem	ANILAB - Animais de Laboratório Criação e Comercial

Ribeirão Preto, 29 de novembro de 2021

Prof. Dr. Luiz Carlos C. Navegantes
Coordenador da CEUA/FMRP-USP