



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica
submetido para avaliação no Edital:
Nº 4/2022.

Título do projeto: Efeitos da inativação temporária do hipocampo dorsal na evocação da memória remota contextual de ratos Wistar treinados com diferentes intensidades de choque.

Palavras-chave do projeto: hipocampo; memória remota; condicionamento de medo contextual;

Área do conhecimento do projeto: Neurociência comportamental, Neurocognição

RESUMO:

A consolidação de memórias é um processo gradual que envolve o lobo temporal medial, em especial o hipocampo. Estudos em ratos mostram que, na tarefa de condicionamento de medo ao contexto (CMC), lesões do hipocampo realizadas logo após o treino prejudicam a evocação desta memória, porém se estas mesmas lesões são feitas um mês após o treino, não há prejuízo da memória contextual. Dessa forma, a teoria clássica sobre consolidação da memória contextual é a de que, direcionadas pelo hipocampo, gradualmente, as memórias tornam-se independentes dessa estrutura e são transferidas para áreas específicas do neocórtex. No entanto, os dados de estudos envolvendo lesão de hipocampo, realizadas após o treino, têm sido controversos, e algumas hipóteses foram levantadas para explicar essas divergências, como a força do treino e diferenças no tipo e extensão da lesão. Estudos realizados previamente em nosso laboratório com a tarefa de CMC com três intensidades de choques distintas (0,3, 0,6 e 1,0 mA) mostraram que, após 28 dias, os animais treinados com choques mais fortes (0,6 e 1,0 mA) apresentaram uma memória contextual generalizada, podendo refletir uma perda de dependência hipocampo e, conseqüentemente, perda de detalhes contextuais. Entretanto, animais treinados com 0,3 mA apresentaram uma memória contextual específica após 28 dias, sugerindo que, com essa intensidade de treino, a memória contextual remota pode continuar dependendo do hipocampo. O presente projeto pretende verificar, através da inativação do hipocampo com o agonista gabaérgico muscimol, administrado antes do teste, se essa estrutura participa da evocação da memória de CMC 28 dias após o treino, em animais treinados com um choque fraco (0,3 mA) ou forte (1,0 mA). Estudos estatísticos de saúde pública salientam o aumento na incidência de casos de transtornos de ansiedade durante a pandemia do SARS-COV e esses transtornos têm como um dos principais sintomas a generalização da memória de medo, isto é, dado uma pouca especificidade da memória contextual o indivíduo é induzido,

mesmo em um contexto seguro, a sentir-se ameaçado e com medo. Nesse sentido, a análise que esse projeto propõe permitirá entender a atuação do hipocampo frente a evocação da memória contextual, contribuindo, também, para o entendimento acerca da generalização da memória e, por conseguinte, dos transtornos que afligem a sociedade pós-moderna.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo específico	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Sujeitos experimentais	12
3.2. Aparelhos	13
3.3. Cirurgia estereotáxica	14
3.4. Drogas	15
3.5. Procedimento da infusão intra-cerebral	15
3.6. Tarefa de condicionamento de medo ao contexto	16
3.7. Delineamento experimental	17
3.8. Análise Histológica	17
3.9. Cálculo do N e Análise Estatística	18
4. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a Neurociência avançou no entendimento de como as memórias são formadas, mas pouco ainda é conhecido sobre como são mantidas e evocadas. O termo “consolidação”, proposto por Müller e Pilzecker, em 1900, refere-se ao fato de que a aprendizagem de uma informação não provoca instantaneamente a formação e permanência de uma memória, ela requer tempo para ser fixada, ou seja, consolidada (para uma revisão, Lechner *et al.*, 1999). Pesquisas neurobiológicas apontam dois processos distintos para a consolidação: um rápido e o outro, lento. O processo rápido, conhecido como “consolidação celular”, envolve modificações morfológicas dos neurônios (crescimento de espinhos dendríticos, por exemplo) e reestruturação das sinapses, que requer a participação de segundos mensageiros, ativação de fatores de transcrição e síntese de proteínas em um circuito local. A consolidação celular opera em um processo com duração de algumas horas (para revisões, Squire & Alvarez, 1995; Frankland & Bontempi, 2005). O outro processo, mais lento e gradual, ocorre no nível de sistemas, isto é, envolvendo várias estruturas cerebrais, principalmente as do lobo temporal medial e estruturas neocorticais (para revisões, Nadel & Moscovith, 1997; Frankland & Bontempi, 2005; Squire & Bayley, 2007, Winocur *et al.*, 2010).

Um caso típico que relata esse processo gradual de consolidação da memória é o do paciente H. M., submetido a uma ressecção bilateral do lobo temporal medial aos 29 anos de idade, em virtude de graves crises epiléticas. As crises continuaram a ocorrer após a cirurgia, porém com menos frequência e sendo menos incapacitantes. Não houve mudança de personalidade, porém uma grave perda de memória foi reportada. H. M. era incapaz de se lembrar de eventos ocorridos até três anos antes de sua cirurgia, mas lembrava-se perfeitamente de sua infância. Ao executar uma tarefa, no momento em que passava para a seguinte, já se esquecia da que havia executado anteriormente. Esse padrão de amnésia que afeta as memórias recentes e mantém intactas as memórias remotas recebeu o nome de

amnésia retrógrada temporalmente graduada (em inglês: *temporally graded retrograde amnesia*) (Scoville & Milner, 1957).

Em ratos, lesões realizadas em uma das principais estruturas do lobo temporal medial, o hipocampo, prejudicaram a tarefa de condicionamento de medo ao contexto (CMC, um tipo de condicionamento clássico em que os animais associam um determinado contexto a um choque nas patas) quando realizadas 1 dia após o treino, mas não causaram prejuízo quando realizadas um mês após o treino (Kim & Fanselow, 1992; Anagnostaras *et al.*, 1999). Assim, a teoria clássica sobre a consolidação da memória (declarativa em humanos e contextual, em ratos) é a de que, direcionadas pelo hipocampo, gradualmente, as memórias tornam-se independentes dessa estrutura e são transferidas para áreas específicas do neocórtex. O hipocampo seria um local de armazenamento temporário das memórias, pois suas sinapses possuem a característica de poder mudar rapidamente. Já as sinapses do neocórtex são mais lentas (para revisões, Squire & Alvarez, 1995; Lechner *et al.*, 1999). O tempo que essas memórias levam para se tornarem independentes do hipocampo varia entre semanas, meses ou mesmo, anos, nos diferentes estudos.

Corroborando a hipótese de que a memória é, inicialmente, dependente do hipocampo e torna-se, gradualmente, independente dessa estrutura, Frankland *et al.* (2004) observaram, por meio da análise da expressão de genes modulados pela atividade neuronal (c-fos e zif268), um aumento da atividade do hipocampo de camundongos quando o teste de condicionamento de medo ao contexto foi realizado 1 dia após o treino (memória recente), mas não quando o teste foi realizado 36 dias mais tarde (memória remota). Por outro lado, o córtex cingulado apresentou maiores níveis de atividade apenas após o teste de memória remota. Da mesma forma, Restivo *et al.*, (2009) mostraram que mudanças estruturais (crescimento de espinhos dendríticos) ocorreram no hipocampo e estavam correlacionadas com a expressão da resposta de medo condicionado ao contexto (congelamento ou *freezing*:

total ausência de movimentos com exceção dos respiratórios) 1 dia, mas não 36 dias após o treino de condicionamento. Um padrão inverso no aumento de espinhos dendríticos foi observado no córtex cingulado. Além disso, a inativação temporária do córtex cingulado prejudicou o teste de condicionamento de medo ao contexto quando realizada 18 ou 36 dias após o treino, mas não teve nenhum efeito 1 ou 3 dias após sua realização (Frankland *et al.*, 2004).

Memórias contextuais são detalhadas, bem integradas, possibilitam certa flexibilidade na manipulação da representação e possuem grande especificidade (Winocur *et al.*, 2010). Porém, com o passar do tempo, tornam-se menos detalhadas e vívidas. Modelos animais em estudos utilizando o CMC mostram que, no ambiente de treino, os animais demonstram maior quantidade de congelamento do que em ambientes diferentes, quando testados logo após o treino. Já nos testes realizados após algumas semanas, os animais tendem a aumentar a quantidade de congelamento nos novos ambientes, demonstrando assim, uma generalização da memória de medo (Wiltgen & Tanaka, 2013). Por exemplo, camundongos treinados na tarefa de condicionamento de medo ao contexto mostraram respostas de medo mais acentuadas quando expostos novamente ao mesmo ambiente do treino, do que quando colocados em um novo contexto, tanto 1 como 14 dias após o treino. No entanto, em testes de memória remota, realizados 28, 36 ou 42 dias após o treino, os camundongos mostraram níveis equivalentes de resposta de medo (congelamento) quando colocados no contexto de treino ou no novo contexto, revelando, portanto, uma generalização da resposta condicionada de medo ao contexto, com o passar do tempo (Wiltgen & Silva 2007; Wang *et al.*, 2011). Possivelmente, as memórias contextuais tornam-se menos específicas com o tempo como resultado da transferência do traço de memória do hipocampo para regiões corticais (Winocur *et al.*, 2010).

No entanto, ainda não se conhecem todos os mecanismos envolvidos na

consolidação e os dados de diversos estudos envolvendo lesões de hipocampo, realizadas tanto antes como em diversos períodos após o treino, têm sido divergentes, evidenciando tanto prejuízo como ausência de efeitos (Maren *et al.*, 1997; Lehmann *et al.*, 2007; Winocur *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; de Oliveira Alvares L *et al.*, 2012; Winocur *et al.*, 2013; Krueger *et al.* 2019, para revisões, ver Wiltgen & Tanaka., 2013 e Yonelinas *et al.*, 2019). Dados recentes têm sugerido que muitas representações de memórias episódicas e contextuais permanecem dependentes do hipocampo, não importando quando foram adquiridas, e que outras podem ser estabelecidas e mantidas independentes da participação dessa estrutura. Lehmann *et al.* (2007) encontraram que lesões no hipocampo de ratos, tanto parciais quanto totais, feitas em diferentes períodos (1 semana, 3 meses e 6 meses) após o treino de condicionamento de medo ao contexto, provocaram uma diminuição dos níveis de congelamento dos animais durante o teste. Esses dados demonstram que memórias remotas também podem depender do hipocampo (para uma revisão, Sutherland & Lehmann, 2011).

A causa das divergências observadas na literatura com relação à participação do hipocampo na memória remota ainda não foi estabelecida, mas algumas hipóteses foram levantadas como, por exemplo, força do treino (diferenças mínimas ou extremas de contexto, intensidade do choque, número de choques emitidos), diferenças no tipo ou extensão da lesão, e a possível ocorrência de convulsões pós-cirúrgicas (Sutherland *et al.*, 2010; Sparks *et al.*, 2011; Wiltgen & Tanaka, 2013).

A diferença nos parâmetros de treino exerce influência fundamental na tarefa de CMC, dado que a intensidade dos choques aos quais os animais são submetidos durante o treino está diretamente relacionada à resposta de congelamento dos animais (Baldi *et al.*, 2004) e à liberação de glicocorticoides (GCs) na corrente sanguínea (Cordero *et al.*, 1998).

Sabe-se que experiências com forte conteúdo emocional são bem lembradas durante longos períodos de tempo, como por exemplo, experiências de eventos aversivos ou

traumáticos. Nesse sentido, a memória contextual de medo, por exemplo, quando consolidada e evocada de maneira específica, permite, evolutivamente, o reconhecimento de situações de risco e comportamentos antecipados como o de luta, de fuga ou de congelamento, uma vez que devido ao seu forte conteúdo emocional são evocadas por períodos mais longos. Contudo, apesar de promoverem antecipação comportamental e possibilidade de esquiva do perigo, essas memórias de medo quando generalizadas desequilibram e podem até colocar em risco a vida do indivíduo. Isso porque, ao passo que o animal deixa de discriminar um contexto seguro de um contexto aversivo as respostas de medo se diferenciam do esperado (Asok et al., 2019; Dunsmoor; Murphy 2015). Dentro desse viés, estudos registraram que como consequência da pandemia do SARS-COV, parte dos indivíduos passaram a desenvolver transtornos de ansiedade, uma vez que o cenário pandêmico promovia um contexto de risco à vida desses indivíduos. Dessa forma, o sintoma da generalização da memória de medo se tornou mais frequente na sociedade pós moderna, visto que, a generalização é um quadro sintomático de transtornos de ansiedade – como o transtorno do pânico e o transtorno de estresse pós-traumático (Santomauro et al., 2021; Sbardelloto et al., 2011).

Estudos realizados em animais e em seres humanos indicam que os hormônios adrenais – adrenalina e glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona – CORT – em ratos) – liberados durante um evento com forte conteúdo emocional ou alertante, apresentam um papel chave no aumento da consolidação de memórias de longo prazo (de Kloet *et al.*, 1999; McGaugh & Roozendaal, 2002; Sandi & Pinelo-Nava, 2007; Asok et al., 2019; Santomauro et al., 2021).

Injeções sistêmicas de baixas doses de corticosterona ou do GC sintético dexametasona melhoraram a memória de tarefas aversivas motivadas, como a esquiva inibitória, o CMC e o labirinto aquático de Morris, quando administradas imediatamente

após o treino (Roozendaal *et al.*, 1996; Sandi & Rose 1997). Por outro lado, a remoção da corticosterona endógena por meio de adrenalectomia prejudicou a memória avaliada pela tarefa do labirinto aquático (Oitzl & de Kloet, 1992; Roozendaal *et al.*, 1996), prejuízo que pode ser revertido pela injeção pós-treino de dexametasona (Roozendaal *et al.*, 1996). Estes resultados sugerem que os GCs endógenos, liberados durante o treino de tarefas aversivas, podem melhorar a consolidação da memória dessas experiências. Evidências apontam para um envolvimento do hipocampo e da amígdala na mediação dos efeitos dos GCs sobre a consolidação da memória (Roozendaal *et al.*, 1996; Roozendaal & McGaugh 1997a; Roozendaal *et al.*, 1999, McGaugh, 2004). Estudos recentes mostram que, além de atuar no hipocampo e na amígdala, os GCs também podem atuar diretamente em algumas regiões corticais, como o córtex pré-frontal e o córtex insular, melhorando a consolidação da memória (Roozendaal *et al.*, 2009; Fornari *et al.*, 2012a). Assim, o fato de os GCs atuarem diretamente no córtex pode indicar que a liberação destes hormônios pode interferir ou modular a consolidação de memórias remotas.

Com o objetivo de investigar o papel da CORT endógena na duração e na especificidade da memória contextual, realizamos em nosso laboratório um experimento no qual grupos diferentes de ratos Wistar foram treinados em caixas de condicionamento onde receberam três choques nas patas, em uma das três intensidades: 0,3, 0,6 ou 1,0 mA. O grupo controle não recebeu choque. Amostras de sangue foram coletadas via caudal após o treino para a análise de CORT. Os testes foram realizados 2, 14 ou 28 dias após o treino, no mesmo contexto (A) ou em um novo contexto (B). Os resultados mostraram que os animais treinados apresentaram níveis maiores de CORT quando comparados aos animais *homecage*. Além disso, o grupo treinado com 1,0 mA apresentou níveis maiores de CORT quando comparado com os grupos 0,3 e sem choque (Corrêa *et al.*, 2019). Durante os testes de memória recente (2 dias após o treino), apenas os animais que receberam choques nas intensidades de 0,6 e 1,0

mA conseguiram discriminar o contexto de treino do novo contexto, já que apresentaram maiores níveis de congelamento no contexto A. Essa discriminação se manteve aos 14 dias, mas não aos 28 dias após o treino, quando os animais treinados com 0,6 e 1,0 mA apresentaram tempos de congelamento semelhantes em ambos os contextos, indicando uma generalização da memória. Já os animais treinados com a intensidade de choque 0,3 mA e reapresentados ao contexto de treino tiveram tempo de congelamento maior do que os animais do mesmo grupo que foram apresentados ao novo contexto tanto 14 como 28 dias após o treino, indicando que os animais treinados com choques de baixa intensidade discriminam os contextos até 28 dias após o treino (Corrêa *et. al.*, 2019).

Estes resultados estão de acordo com a literatura, mostrando que treinos mais fortes induzem generalização em testes de memória remota (Pedraza *et al.*, 2016; Poulos *et al.*, 2016), enquanto treinos fracos criam traços de memória específicos por mais tempo. Poulos e cols. (2016) observaram que treinos com 2 e 5 choques de 1,2 mA levam a generalização da memória aos 28 dias, mas treinos com 1 choque mantêm uma a especificidade da memória (Poulos *et al.*, 2016). Pedraza e cols. (2016) observaram que os animais submetidos ao treino forte (8 choques de 1,0 mA) generalizam o contexto de treino e o novo contexto após 15 dias, enquanto os animais que passaram pelo treino fraco (4 choques de 0,4 mA) continuam discriminando ambos os contextos por até 40 dias (Pedraza *et al.*, 2016). O resultado de nosso trabalho com o choque mais fraco (0,3 mA) vai de encontro aos resultados obtidos nestes estudos com seus protocolos de treino fraco. Além disso, verificamos que com os treinos mais fortes, os animais apresentam uma generalização entre os contextos nos testes de memória remota, o que replica os resultados da literatura. Uma possível explicação para estes resultados é que níveis baixos de CORT plasmática, após o treino, retardam a consolidação sistêmica, mantendo a memória contextual dependente do hipocampo por mais tempo, e consequentemente, mantendo a memória mais específica. Por outro lado, altos níveis de

CORT plasmática, após o treino, aceleram a consolidação sistêmica, contribuindo assim para a generalização da memória contextual com o passar do tempo, tornando a mesma independente do hipocampo (Pedraza *et al.*, 2016).

O presente projeto pretende confirmar a hipótese acima, através da inativação do hipocampo com o agonista gabaérgico muscimol, antes do teste de CMC realizado 28 dias após o treino, em animais treinados com 0,3mA ou 1,0 mA. Nossa hipótese é que essa inativação irá prejudicar a evocação da memória de CMC apenas nos animais que receberam um treino fraco.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente projeto será analisar o perfil de consolidação sistêmica de animais treinados com diferentes intensidades de choque na tarefa de CMC.

2.1. Objetivo específico

Verificar os efeitos da inativação temporária do hipocampo dorsal, através de infusões intrahipocampais de muscimol antes do teste de medo condicionado ao contexto, realizado 28 dias após o treino, em animais treinados com choques de 0,3mA ou 1,0 mA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Sujeitos experimentais

Serão utilizados ratos Wistar, machos, com 3 meses de idade, provenientes do laboratório de experimentação animal INFAR/UNIFESP. Os animais serão mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e período claro/escuro de 12/12 horas (período claro começando às 7:00h) e alimento e água “*ad libitum*”. Todos os procedimentos descritos serão realizados de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a utilização de

Animais para fins científicos e didáticos (DBCA) e com a aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do ABC (CEUA-UFABC), sob protocolo nº 6893221018.

3.2. Aparelhos

O treino e os testes serão conduzidos em uma caixa automatizada de condicionamento de medo (Med Associates, Inc., St. Albans, VT), conectadas a componentes geradores de estímulos de choque e som e, também, a uma interface computadorizada que permite a gravação de vídeo, análise e mensuração em tempo real do comportamento de congelamento e atividade locomotora do rato (Video Freeze, Versão 1.12.0.0, Med-Associates).

A caixa de condicionamento (Contexto A) possui 32 cm de largura, 25 cm de altura e 25 cm de profundidade e um piso de grade de aço inoxidável, composto por 20 hastes de 4,8 mm de diâmetro cada, pelas quais os animais receberão o choque nas patas. As paredes superior e frontal são de policarbonato transparente e ao fundo e nas laterais são de acrílico branco. A caixa de condicionamento está dentro de uma caixa de isolamento acústico (64 cm × 76 cm × 42 cm) e é iluminada por uma fonte de luz fluorescente, que fornece um espectro de luz branca (450 – 650 nm) e de infravermelho (940 nm), invisível ao rato, possibilitando a filmagem mesmo com a caixa sem luz visível. Tanto durante o treino como durante o teste a luz da caixa permanecerá acesa, e a limpeza entre cada animal será feita com solução de álcool diluído a 10%.

Durante treino e teste, câmeras de vídeo digitais, sensíveis à luz infravermelha, presas às caixas de isolamento acústico, capturam os dados para gravação enquanto que, simultaneamente, o software Video Freeze faz toda a análise em tempo real, por meio de um algoritmo que analisa 30 quadros (frames) por segundo de vídeo e que o converte todo em

imagens compostas por pixels. Antes da colocação de cada rato dentro da caixa de condicionamento, o sistema passa por uma calibração para estabelecer uma referência da imagem gravada apenas do contexto, a qual será a linha de base para comparação de quando o rato for colocado. Uma vez que a sessão é iniciada, os pixels convertidos dos quadros de vídeo são sucessivamente comparados com a amostra de referência e ao frame anterior. As eventuais diferenças entre pixels do vídeo atual com a amostra de referência e o frame anterior são interpretadas como movimento do animal. O Índice de Movimentação de cada rato é obtido, portanto, por um cálculo que leva em consideração a somatória dessas diferenças (em pixels). Por sua vez, quando o Índice de Movimentação cai abaixo do limiar, determinado arbitrariamente antes do início do procedimento, considera-se este período como Tempo de Congelamento (Anagnostaras et. al., 2010). Através da padronização de parâmetros – seguindo o protocolo de Anagnostaras e cols. (2010) – realizada em nosso laboratório, foram definidos os parâmetros de limiar de movimento em 20 unidades arbitrárias e em 30 frames.

A intensidade dos choques será medida antes do início das sessões de treino com o aparelho AMP Meter (ENV-420, Med Associates, Inc.). Esse aparelho medirá a corrente do estímulo aversivo das caixas da Med Associates. O aparelho será acoplado ao computador por uma porta USB e às barras do piso das caixas com cabos de garra jacaré próprias de voltímetros e amperímetros. A corrente elétrica será medida pelo software de nome análogo e exibida em mA. Essa medição é importante para certificar que a intensidade do choque administrado está correta.

3.3. Cirurgia estereotáxica

A cirurgia estereotáxica será realizada pelo menos 7 dias após o treino de condicionamento de medo ao contexto. Brevemente, os animais serão anestesiados com uma associação de quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e colocados no aparelho

estereotáxico. O crânio será exposto e pequenos orifícios serão feitos em cada hemisfério para a implantação bilateral de cânulas-guia no hipocampo dorsal, utilizando as seguintes coordenadas de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (2006): [AP] -4,2mm; [ML] $\pm 3,0$ mm; [DV] -1,8mm. Posteriormente as cânulas-guia serão fixadas com cimento dental. Será colocado um mandril em cada cânula para evitar a obstrução das mesmas. Logo após a cirurgia, o animal receberá uma dose do antibiótico enrofloxacino e uma dose do anti-inflamatório meloxicam. A saúde do animal será avaliada diariamente por meio da observação do estado da sutura, entupimento de cânulas, indícios de infecção, atividade locomotora e comportamento. Serão verificados possíveis sinais de dor que implicará na administração suplementar de analgésicos (meloxicam e/ou paracetamol). Cada rato terá no mínimo 7 dias para recuperação antes do teste comportamental e seu peso será medido diariamente. Caso haja percentual de perda de peso significativo, o animal será eutanasiado.

3.4. Drogas

Será utilizado o agonista do receptor GABA-A, muscimol (Sigma-Aldrich), – dissolvido em solução salina tamponada em fosfato (PBS, 0,1 M) na concentração de 1 μ g/ μ l. A droga será administrada de forma aguda e intracerebral, no volume de 0,5 μ l por lado, 15 minutos antes do teste de CMC (Pedraza *et al.*, 2017). Os animais controles receberão PBS no mesmo volume e velocidade de administração utilizados para o muscimol.

3.5. Procedimento da infusão intra-cerebral

As soluções serão infundidas através de agulhas de microinjeção que se estendem 2 mm abaixo das cânulas-guia. Para as infusões, cada animal será novamente colocado no colo do experimentador, o mandril será retirado e a agulha de microinjeção será colocada dentro da cânula-guia. Cada agulha será fixada à extremidade de uma seringa Hamilton de 5 ou 10 μ l por meio de um tubo de polietileno (PE-10). As injeções serão controladas por uma bomba de

infusão (Modelo Bi2000 – Insight Equipamentos LTDA) programada para infundir o volume desejado em uma velocidade constante (60 μ L por hora). O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno durante a infusão será utilizado para confirmar a administração das soluções. Após o término da injeção, a agulha de microinjeção permanecerá dentro da cânula-guia por mais 30 segundos para permitir a difusão da droga. Durante a injeção, os animais poderão se movimentar, porém serão gentilmente restringidos ao colo do experimentador. Após o término da microinfusão, os mandris serão recolocados e o animal será colocado em uma caixa individual.

3.6. Tarefa de condicionamento de medo ao contexto

Previamente a qualquer procedimento experimental, as caixas coletivas dos animais são transportadas para sala de manipulação (sala de apoio ao lado da sala de condicionamento). Durante o treino e o teste, cada animal é transportado para sala de condicionamento em sua respectiva caixa individual e, após a realização do treino ou do teste, retornado à sala de manipulação na mesma caixa. Depois de qualquer procedimento experimental, cada animal permanece em sua caixa individual na sala de manipulação por pelo menos 1 hora antes de ser retornado à sua caixa coletiva.

Antes do treino os animais serão manipulados pelo experimentador por 3 dias, na sala de manipulação, para se acostumarem com este e com os procedimentos de infusão intracerebral. No dia do treino, todos os animais serão individualmente transportados para a sala de condicionamento e colocados no contexto A. Após 2 minutos, cada animal receberá três choques nas patas (estímulo incondicionado) de 1s e de uma mesma intensidade (0,3mA ou 1,0 mA) dependendo do grupo. O intervalo entre os choques será de trinta segundos. Um minuto após o último choque, o rato será retirado da câmara de condicionamento. Dessa maneira, cada sessão de condicionamento durará em torno de 240s. No dia do teste, cada

animal receberá a microinjeção de muscimol, conforme descrito no item 3.5, e 15 minutos após, retornará ao mesmo ambiente do treino (contexto A) durante 5 minutos (300s). O tempo total de congelamento será registrado e quantificado pelo sistema da MedAssociates. Nenhum choque será liberado durante o teste.

3.7. Delineamento experimental

Os animais serão submetidos primeiro à sessão de treino, recebendo os três choques de uma mesma intensidade (0,3mA ou 1 mA) dependendo do grupo. Após pelo menos 7 dias, será feita a cirurgia estereotáxica, seguida do período de recuperação. A sessão de teste ocorrerá 28 dias após o treino. O delineamento experimental pode ser visto na figura 1.

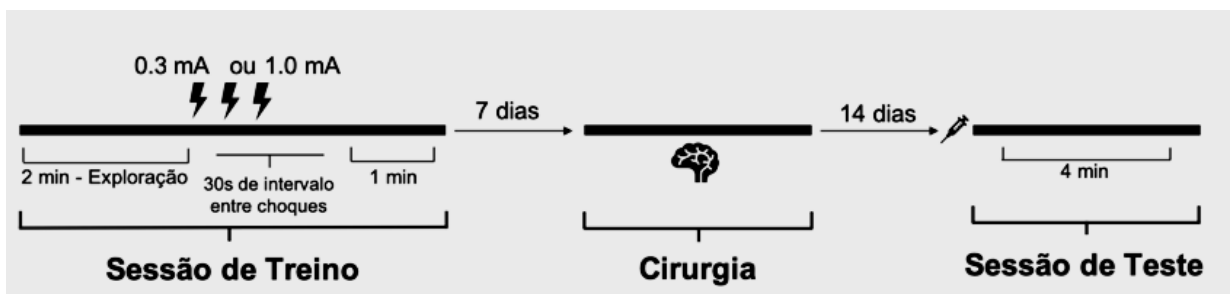


Figura 1: Fluxograma representando o delineamento experimental.

3.8. Análise Histológica

Para verificar se as cânulas foram implantadas corretamente, após finalização dos testes comportamentais, os animais serão profundamente anestesiados com uma sobredose de solução de uretana a 25%. Os mandris serão retirados e cada animal receberá microinjeções bilaterais de corante azul de metileno (1%), de mesma dose e velocidade que o PBS ou muscimol, de acordo com o procedimento descrito no item 3.5. Dez minutos após a microinfusão, os animais serão decapitados e seus encéfalos removidos e congelados a -80°C para armazenamento. O procedimento histológico será realizado utilizando um criostato de

congelamento (Leica Microsystems), com a temperatura interior mantida em torno de -18°C. A localização das cânulas será verificada em cortes coronais de 40µm, os quais serão montados em lâminas e submetidos à coloração de Nissl com cresil violeta. A localização das infusões será verificada cuidadosamente com o uso do microscópio (Leica Microsystems, modelo 5500) e do atlas de coordenadas estereotáxicas (Paxinos & Watson, 2006).

3.9. Cálculo do N e Análise Estatística

Serão utilizados no máximo até 15 animais por grupo, de acordo com a fórmula do cálculo do N indicada pelo CEUA da UFABC.

Serão realizados 4 grupos (animais treinados com 0,3mA ou 1,0 mA que receberão Muscimol ou PBS) e serão utilizados, portanto, no máximo 60 animais. As médias dos grupos serão comparadas através de uma ANOVA de 2 vias em que a variável dependente será o congelamento total no contexto A e os fatores serão a intensidade de choque (0,3mA ou 1,0mA) e o tratamento farmacológico (Muscimol ou PBS). Os grupos PBS serão utilizados como grupos controles do experimento.

4. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

[illegible]

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anagnostaras, S. G., Maren, S., & Fanselow, M. S. (1999). **Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination.** *The Journal of neuroscience*, 19(3), 1106-1114.

Asok, A.; Kandel, E. R.; Rayman, J. B. **The neurobiology of fear generalization.** *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 12, n. January, p. 1–15, 2019.

Baldi, E., Lorenzini, C. A., & Bucherelli, C. (2004). **Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat.** *Neurobiology of learning and memory*, 81(3), 162-166.

Cordero, M. I., Merino, J. J., & Sandi, C. (1998). **Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning.** *Behavioral neuroscience*, 112(4), 885.

Corrêa, M. D. S., Vaz, B. D. S., Grisanti, G. D. V., et al. (2019). **Relationship between footshock intensity, post-training corticosterone release and contextual fear memory specificity over time.** *Psychoneuroendocrinology*.

de Kloet, E. R., Oitzl, M. S., & Joëls, M. (1999). **Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys?** *Trends in neurosciences*, 22(10), 422-426.

Dunsmoor, J. E.; Murphy, G. L. **Categories, concepts, and conditioning: How humans generalize fear.** *Trends in Cognitive Sciences*, v. 19, n. 2, p. 73–77, 2015. Elsevier Ltd.

Fornari, R. V., Wichmann, R., Atsak, P., Atucha, E., Barsegyan, A., Beldjoud, H., ... & Roozendaal, B. (2012a). **Rodent stereotaxic surgery and animal welfare outcome improvements for behavioral neuroscience.** *Journal of visualized experiments: JoVE*, (59).

Fornari, R. V., Wichmann, R., Atucha, E., Desprez, T., Eggens-Meijer, E., & Roozendaal, B. (2012b). **Involvement of the insular cortex in regulating glucocorticoid effects on memory consolidation of inhibitory avoidance training.** *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 10.

Frankland, P. W. & Bontempi, B. (2005). **The organization of recent and remote memories.** *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2), 119-130.

Frankland, P. W., Bontempi, B., Talton, L. E., Kaczmarek, L., & Silva, A. J. (2004). **The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory.** *Science Signaling*, 304(5672), 881.

Itoh, K., Konishi, A., Nomura, S., Mizuno, N., Nakamura, Y., & Sugimoto, T. (1979). **Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method.** *Brain research*, 175(2), 341.

Kim, J. J. & Fanselow, M. S. (1992). **Modality-specific retrograde amnesia of fear.** *Science*, 256(5057), 675-677.

Krueger J. N., Wilmot, J. H., Teratani-ota, Y. *et al* (2019). **Recently formed context fear memories can be retrieved without the hippocampus.** *bioRxiv*.

Lechner, H. A., Squire, L. R., & Byrne, J. H. (1999). **100 years of consolidation—remembering Müller and Pilzecker.** *Learning & Memory*, 6(2), 77-87.

Lehmann H, Lacanilao S, Sutherland RJ (2007). **Complete or partial hippocampal damage produces equivalent retrograde amnesia for remote contextual fear memories.** *European Journal of Neuroscience*, 25,1278-1286.

Maren, S., Aharonov, G., & Fanselow, M. S. (1997). **Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats.** *Behavioural brain research*, 88(2), 261-274.

McGaugh, J. L. (2000). **Memory--a century of consolidation.** *Science*,287(5451), 248-251.

McGaugh, J. L. (2004). **The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences.** *Annual Review of Neuroscience*, 27, 1-28.

McGaugh, J. L., & Roozendaal, B. (2002). **Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain.** *Current opinion in neurobiology*, 12(2), 205-210.

Nadel, L., & Moscovitch, M. (1997). **Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex.** *Current opinion in neurobiology*, 7(2), 217-227.

Oitzl, M. S., & de Kloet, E. R. (1992). **Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning.** *Behavioral neuroscience*, 106(1), 62.

de Oliveira Alvares, L., Einarsson, E. Ö., Santana, F., Crestani, A. P., Haubrich, J., Cassini, L. F., ... & Quillfeldt, J. A. (2012). **Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus.** *Hippocampus*, 22(5), 1092-1095.

Restivo, L., Vetere, G., Bontempi, B., & Ammassari-Teule, M. (2009). **The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex.** *The Journal of Neuroscience*, 29(25), 8206-8214.

Reul, J. M. H. M., & De Kloet, E. R. (1985). **Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation.** *Endocrinology*, 117(6), 2505-2511.

Roozendaal, B., McEwen, B. S., & Chattarji, S. (2009). **Stress, memory and the amygdala.** *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 423-433.

Roozendaal, B., Nguyen, B. T., Power, A. E., & McGaugh, J. L. (1999). **Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11642-11647.

Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1997a). **Basolateral Amygdala Lesions Block the Memory-enhancing Effect of Glucocorticoid Administration in the Dorsal Hippocampus of Rats.** *European Journal of Neuroscience*, 9(1), 76-83.

Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1997b). **Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage.** *Neurobiology of learning and memory*, 67(2), 176-179.

Roozendaal, B., Portillo-Marquez, G., & McGaugh, J. L. (1996). **Basolateral amygdala lesions block glucocorticoid-induced modulation of memory for spatial learning.** *Behavioral neuroscience*, 110(5), 1074.

Sandi, C., & Pinelo-Nava, M. T. (2007). **Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms.** *Neural plasticity*, 2007.

Sandi, C., & Rose, S. P. (1994). **Corticosterone enhances long-term retention in one-day-old chicks trained in a weak passive avoidance learning paradigm.** *Brain Research*, 647(1), 106-112.

Sandi, C., & Rose, S. P. (1997). **Training-dependent biphasic effects of corticosterone in memory formation for a passive avoidance task in chicks.** *Psychopharmacology*, 133(2), 152-160.

Santomauro DF, Mantilla Herrera AM, Shadid J, Zheng P, Ashbaugh C, Pigott DM, et al.(2021). **Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic.** *Lancet* 2021;398:1700–12.

Sbardelloto, G.; Schaefer, L. S.; Justo, A. R.; Haag Kristensen, C. **Transtorno de estresse pós-traumático: evolução dos critérios diagnósticos e prevalência.** *Psico-USF*, v. 16, n. 1, p. 67–73, 2011.

Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). **Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions.** *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 20(1), 11.

Squire, L. R., & Alvarez, P. (1995). **Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective.** *Current opinion in neurobiology*, 5(2), 169-177

Squire, L. R., & Bayley, P. J. (2007). **The neuroscience of remote memory.** *Current opinion in neurobiology*, 17(2), 185-196.

Sutherland, R. J., Sparks, F. T., & Lehmann, H. (2010). **Hippocampus and retrograde amnesia in the rat model: a modest proposal for the situation of systems consolidation.** *Neuropsychologia*, 48(8), 2357-2369.

Sutherland, R. J., & Lehmann, H. (2011). **Alternative conceptions of memory consolidation and the role of the hippocampus at the systems level in rodents.** *Current Opinion in Neurobiology*, 21(3), 446-451.

Wang, D. V., Wang, F., Liu, J., Zhang, L., Wang, Z., & Lin, L. (2011). **Neurons in the amygdala with response-selectivity for anxiety in two ethologically based tests.** *PloS one*, 6(4), e18739.

Wang, S. H., Teixeira, C. M., Wheeler, A. L., & Frankland, P. W. (2009). **The precision of remote context memories does not require the hippocampus.** *Nature neuroscience*, 12(3), 253-255.

Wiltgen, B. J., & Silva, A. J. (2007). **Memory for context becomes less specific with time.** *Learning & Memory*, 14(4), 313-317.

Wiltgen, B. J., & Tanaka, K. Z. (2013). **Systems Consolidation and the Content of Memory.** *Neurobiology of Learning and Memory*. 106, 365-371.

Winocur, G., Moscovitch, M., & Sekeres, M. (2007). **Memory consolidation or transformation: context manipulation and hippocampal representations of memory.** *Nature neuroscience*, 10(5), 555-557.

Winocur, G., Moscovitch, M., & Bontempi, B. (2010). **Memory formation and long-term retention in humans and animals: Convergence towards a transformation account of hippocampal–neocortical interactions.** *Neuropsychologia*, 48(8), 2339-2356.

Winocur, G., Sekeres, M. J., Binns, M. A., & Moscovitch, M. (2013). **Hippocampal lesions produce both nongraded and temporally graded retrograde amnesia in the same rat.** *Hippocampus*, 23(5), 330-341.

Yonelinas, A. P., Ranganath, C., Ekstrom, A. D., Wiltgen, B. J. (2019). **A contextual binding theory of episodic memory: systems consolidation reconsidered.** *Nature Reviews Neuroscience*.

Zola-Morgan, S. M., & Squire, L. R. (1990). **The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage.** *Science*, 250(4978), 288-290.