

ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS NORADRENÉRGICO E DOPAMINÉRGICO NO EFEITO DA NOVIDADE NA GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA

Karine Ramires Lima¹

Pamela Billig Mello Carpes²

Liane da Silva de Vargas³

Resumo:

A generalização da memória aversiva pode ser definida como um fenômeno no qual uma situação similar (porém distinta) a um evento aversivo prévio pode desencadear uma resposta defensiva e está relacionada a vários distúrbios psicológicos. Neste estudo, investigamos os efeitos da novidade na generalização das memórias de medo e a participação dos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico neste processo. Para testar a memória aversiva e a generalização desta utilizamos a tarefa de memória "esquiva inibitória" (EI). No dia 1, ratos Wistar machos adultos foram treinados na EI. No dia 2, os animais foram expostos à uma esquiva inibitória modificada (EM) durante 3 minutos 30 minutos antes da exposição à EM alguns animais foram expostos à uma novidade (campo aberto) durante 5 minutos. Para avaliar o envolvimento dos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico, imediatamente antes da exposição à novidade, alguns animais receberam uma infusão intrahipocampal de timolol (antagonista -adrenérgico), SCH23390 (antagonista D1/D5) ou veículo. No dia 3, para avaliar, respectivamente, a memória aversiva e generalização da memória aversiva metade dos animais de cada grupo foram testados na EI e outra metade na EM. Neste estudo demonstramos que a exposição à novidade evita a generalização da memória aversiva e que esse processo é dependente da ativação das vias -adrenérgica e dopaminérgica D1/D5 hipocampal, uma vez que o bloqueio destas vias na região CA1 do hipocampo com a infusão intrahipocampal de timolol ou SCH23390, respectivamente, imediatamente antes da exposição à novidade inibe seu efeito. Além disso, observamos que a exposição à novidade eleva os níveis hipocampais de noradrenalina e dopamina, o que sugere que o aumento desses neurotransmissores pode influenciar a promoção da memória de longa duração, melhorando a memória e atenuando a generalização da memória aversiva.

Palavras-chave: memória; memória aversiva; generalização; sistema noradrenérgico; sistema dopaminérgico.

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS NORADRENÉRGICO E DOPAMINÉRGICO NO EFEITO
DA NOVIDADE NA GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA**

¹ Aluno de graduação. karineramires96@gmail.com. Autor principal

² Docente. pamelacarpes@unipampa.edu.br. Orientador

³ Docente; Aluno de pós graduação. lianeevargas@gmail.com. Co-orientador

ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS NORADRENÉRGICO E DOPAMINÉRGICO NO EFEITO DA NOVIDADE NA GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA

1 INTRODUÇÃO

A generalização da memória aversiva ocorre com base na semelhança entre uma situação atual e experiências aversivas anteriores. Neste caso, o indivíduo responde de uma forma defensiva a um estímulo semelhante (porém distinto) a um evento aversivo anteriormente vivenciado (ONAT; BUCHEL, 2015). Fenômenos como este estão frequentemente associado à fisiopatologia de doenças como o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) (COSTANZI et al., 2011) e a síndrome do pânico, uma vez que podem levar a respostas exacerbadas e inapropriadas de medo (ONAT; BUCHEL, 2015).

Apesar da generalização da memória aversiva não ser um fenômeno novo, é recente a maior atenção ao estudo de seus mecanismos neurais (JASNOW et al., 2016). Entretanto, ainda são relativamente pouco investigadas as influências de atitudes comportamentais e estímulos sensoriais sobre a generalização da memória (HUCKLEBERRY; FERGUSON, 2016), bem como os mecanismos que possam minimizar seus efeitos (JASNOW et al., 2016). Neste contexto se tem pensado em estratégias que possam tornar menos intensas as respostas exacerbadas de medo e atenuar a generalização, bem como tem-se buscado por intervenções para o tratamento de doenças como o TEPT e seus sintomas.

Já foi demonstrado que a exposição a uma novidade facilita a aprendizagem (MONCADA; VIOLA, 2007; MENEZES et al., 2015). A novidade possui grande influência neuromoduladora sobre a formação da memória, provocando respostas em uma ampla variedade de áreas cerebrais (SCHOMAKER; MEETER, 2015). Sabe-se que a exposição à novos estímulos e ambientes tende a ativar regiões como *locus coeruleus* (LC) e área tegmentar ventral (ATV), principais responsáveis pela liberação de noradrenalina e dopamina, respectivamente (BUNZECK; DÜZEL, 2006; LI et al., 2003). Desta forma, o estudo da novidade tem sido relacionado ao incremento da liberação destes neurotransmissores (MONCADA; BALLARINI; VIOLA, 2015).

Além disso, em um estudo recente do nosso grupo, demonstramos que a exposição à novidade previamente a um ambiente similar a um aversivo já conhecido pelo animal evita a generalização da memória aversiva, fenômeno este que depende da síntese proteica no hipocampo (VARGAS et al., submetido). Diante disto, estes estudos nos motivaram a investigar a participação dos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico no efeito da novidade diante de um protocolo comportamental que induz a generalização da memória aversiva.

2 METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Pampa (protocolo número 001/2017). A amostra foi composta por 111 ratos adultos machos da linhagem Wistar (3 meses de idade, 300-400g).

Etapas: Este estudo foi dividido em duas etapas a fim de, respectivamente, investigar: (I) a participação do sistema noradrenérgico e dopaminérgico no processo de modulação da generalização da memória aversiva sob efeito da novidade; e, (II) os efeitos da exposição a uma novidade sobre os níveis hipocampais de noradrenalina e dopamina de ratos *Wistar*.

Procedimentos: Para testar a memória aversiva e a generalização desta utilizamos a tarefa de memória "esquiva inibitória" (EI). A EI é um aparato em forma de caixa, com o assoalho revestido de barras eletrificáveis. Dentro da caixa há uma plataforma. No dia 1, ratos *Wistar* machos adultos foram treinados na EI, sendo colocados na plataforma; ao descer desta receberam um estímulo elétrico de 0,7 mA por 2 segundos. No dia 2, os animais foram expostos à uma esquiva inibitória modificada (EM; descrita posteriormente) para exploração durante 3 minutos. Neste mesmo dia, trinta minutos antes da exposição à EM alguns animais

foram expostos à uma novidade (um campo aberto desconhecido) durante 5 minutos. Para avaliar o envolvimento dos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico (etapa I), imediatamente antes da exposição à novidade, alguns animais receberam uma infusão intrahipocampal de timolol (antagonista β -adrenérgico), SCH23390 (antagonista D1/D5) ou veículo. No dia 3, para avaliar, respectivamente, a memória aversiva e generalização da memória aversiva metade dos animais de cada grupo foi testada na EI e outra metade na EM. Para verificar se a exposição à novidade aumenta os níveis de noradrenalina e/ou dopamina no hipocampo (etapa II), no dia 1 os animais do grupo controle e novidade foram treinados na EI; no dia 2, 30 minutos após a exposição à novidade (grupo novidade), ou no tempo equivalente, no caso dos demais grupos (controle e *naive*) os animais foram eutanasiados e seu cérebro foi dissecado rapidamente, em superfície de gelo, para retirada do hipocampo e posterior análise bioquímica por CLAP (Cromatografia Líquida de Alta Precisão).

Protocolos:

Cirurgia estereotáxica: Os animais da etapa I foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia de 0,2 mm na região CA1 do hipocampo dorsal. Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com cetamina e xilazina, administrados intraperitonealmente. Após as cirurgias, os animais foram colocados novamente em suas caixas de moradia e mantidos sob recuperação por dois dias.

Manipulação dos animais: Para reduzir o estresse dos animais e garantir maior contato com o experimentador, dois dias antes de iniciar os testes comportamentais, os animais passaram por duas sessões de manipulação de 5 minutos cada.

Tarefa de memória: A tarefa de memória foi realizada na EI. Este aparato consiste de uma caixa de madeira com a parede frontal feita de acrílico (50 x 25 x 50cm), assoalho formado por barras de bronze paralelas, contendo ao lado esquerdo da caixa uma plataforma; este aparato foi utilizado para avaliar a memória aversiva. Para avaliar a generalização da memória aversiva, foi utilizada uma esQUIVA inibitória modificada (EM), que possui as mesmas características da EI e, adicionalmente, um assoalho preto ao invés das barras eletrificáveis, uma faixa preta horizontal nos quatro lados da parede interna da esQUIVA, aroma cítrico e luz vermelha projetada sob o aparato.

Exposição à novidade: A novidade consiste em um ambiente novo, previamente desconhecido pelos animais. Neste estudo utilizamos um *campo aberto* ou *Open Field (OF)*, uma caixa de madeira (60 x 40 x 50 cm) com a parede frontal de vidro transparente.

Análise estatística: Inicialmente, a normalidade dos dados foi testada. Verificada a distribuição não-paramétrica, adotou-se o teste de Wilcoxon para comparação intragrupo das latências de descida da plataforma da esQUIVA inibitória no treino e no teste, e o teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* Dunn para comparação das latências de teste entre os grupos. Para os resultados de CLAP, os dados dos três grupos foram comparados usando ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis com o teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em $P \leq 0,05$.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os resultados da etapa I para investigação dos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico foram semelhantes (Figura 1 e 2). No teste de retenção na EI (dia 3), não houve diferença significativa entre os grupos. No entanto, a latência de descida foi significativamente maior do que a apresentada no dia de treinamento, indicando que todos os grupos foram capazes de reconhecer o ambiente aversivo (eles foram treinados e testados no mesmo ambiente; Figura 1A e 2A). No teste de retenção na EM, o grupo controle apresentou latência de descida maior quando comparada ao dia de treino, expressando, portanto, uma generalização da memória aversiva, uma vez que não houve a distinção dos ambientes

apresentados no treino e no teste (eles foram treinados e testados em ambientes semelhantes, mas não iguais). O grupo exposto à novidade não apresentou diferença significativa entre o dia do teste e do treino, demonstrando, assim, que os animais conseguiram diferenciar os ambientes, evitando a generalização da memória. Entretanto, a infusão intra-hipocampal de timolol ou SCH23390 imediatamente antes da exposição à novidade bloqueou o efeito da novidade, e os animais passaram a generalizar a memória de medo (Figura 1B e 2B).

Figura 1 - A infusão de timolol na região CA1 do hipocampo imediatamente antes da exposição de novidades bloqueia o efeito de modulação da novidade na generalização da memória aversiva. Os dados representam a latência de descida da plataforma no teste na EI (A) ou EM (B) e são expressos como média $\pm$ SEM. # $P \leq 0,05$ no teste de Wilcoxon (treino x teste); * $P \leq 0,05$ na ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis com o teste de comparações múltiplas de Dunn; $n = 8$ por grupo.

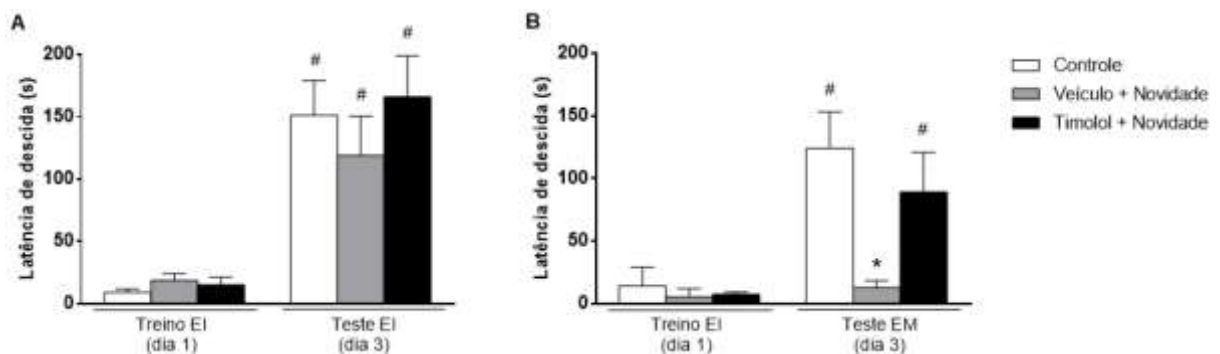
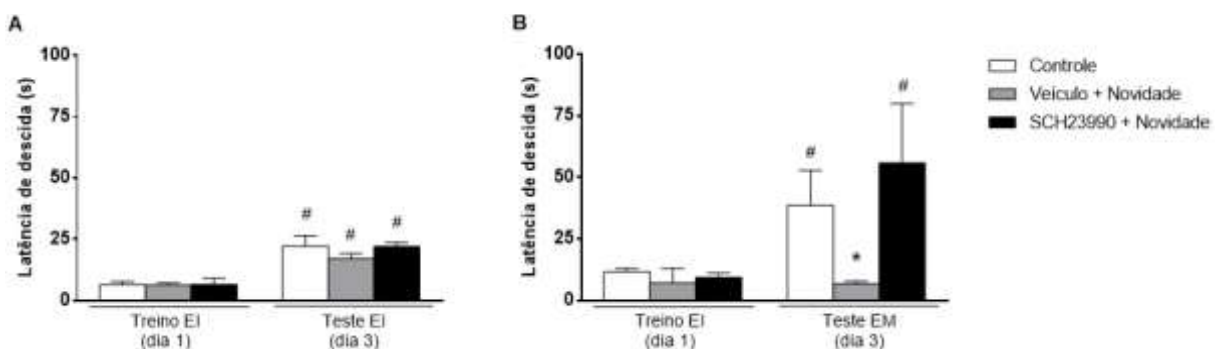


Figura 2 - A infusão de SCH23390 na região CA1 do hipocampo imediatamente antes da exposição de novidades bloqueia o efeito de modulação da novidade na generalização da memória aversiva. Os dados representam a latência de descida no teste na EI (A) ou EM (B) e são expressos como média $\pm$ SEM. # $P \leq 0,05$ no teste de Wilcoxon (treino x teste); * $P \leq 0,05$ na ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis com o teste de comparações múltiplas de Dunn; $n = 8$ por grupo.

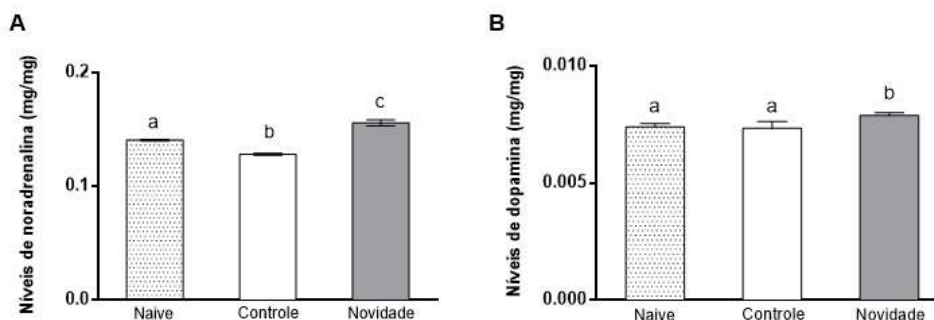


Desta forma, neste estudo demonstramos que a exposição à novidade evita a generalização da memória aversiva e que esse processo é dependente da ativação das vias β -adrenérgica e dopaminérgica D1/D5 hipocampal, uma vez que o bloqueio destas vias na região CA1 do hipocampo com a infusão intrahipocampal de timolol ou SCH23390, respectivamente, imediatamente antes da exposição à novidade, inibe seu efeito.

Adicionalmente, na etapa II, observamos que a exposição à novidade eleva os níveis hipocampais de noradrenalina e dopamina (Figura 3), o que sugere que o aumento desses

neurotransmissores pode influenciar a promoção da memória de longa duração, melhorando a memória e atenuando a generalização da memória aversiva.

Figura 3 - A exposição à novidade promove o aumento dos níveis de noradrenalina e dopamina no hipocampo. Os dados representam os níveis de noradrenalina (A) e dopamina (B) no homogenato de hipocampo (mg/mg) e são expressos como média $\pm$ DP; grupos com letras diferentes foram significativamente diferentes. $P \leq 0,05$ na ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis com teste de comparações múltiplas de Dunn; $n = 5$ por grupo, analisados em triplicata.



A exposição à novidade tem sido amplamente investigada por suas implicações na formação das memórias de longa duração ou LTMs (do inglês, *long term memory*) (MONCADA; VIOLA, 2007; BALLARINI ET AL., 2009). Um estímulo que formaria apenas memórias de curta duração ou STMs (do inglês, *short term memory*) pode formar LTMs por influência da exposição à novidade (MONCADA ET AL., 2011). Este fenômeno vem sendo explicado através da hipótese de marcação e captura sináptica ou STC (do inglês, *synaptic tagging and capture*) proposta por Frey e Morris (1997). De acordo com esta hipótese, tanto o treinamento na EI como a exposição à novidade são considerados fortes estímulos capazes de induzir a produção de proteínas relacionadas à plasticidade (PRPs). A exposição à EM, um estímulo fraco, quando associado a uma janela de tempo próxima a um estímulo forte (como novidade) é capaz de receber essas PRPs, o que leva à promoção de uma potenciação de longa duração ou LTP (do inglês, *long term potentiation*) e consequente LTM. No entanto, apenas a exposição à EM não é forte o suficiente para levar à síntese de PRPs e a sinapse marcada retorna gradualmente ao seu estado basal. O grupo novidade, dessa forma, tende a gerar uma LTM para exposição à EM, o que impede a generalização da memória aversiva. Em contrapartida, o grupo controle não é capaz de gerar uma LTM para exposição à EM, o que leva a uma consequente generalização da memória aversiva.

Estudos recentes têm mostrado que a ativação de receptores noradrenérgicos e dopaminérgicos é um fator importante para o controle da síntese de PRPs (MONCADA; BALLARINI; VIOLA, 2015; MONCADA, 2016). Moncada et al. (2011) observaram que o uso de antagonistas β -adrenérgicos e D1/D5 dopaminérgicos (Propranolol e SCH23390) no hipocampo dorsal é capaz de bloquear o efeito de novidade, interferindo na promoção de LTM. Outra evidência encontrada pelos mesmos autores é que, ao contrário do uso de antagonistas, os agonistas β -adrenérgicos e dopaminérgicos (dobutamina e SKF 38393) por administração intraperitoneal são capazes de conduzir a promoção de LTM através de um mecanismo dependente da síntese proteica. Esses estudos são consistentes com os nossos resultados, pois verificamos que o bloqueio dos receptores β -adrenérgicos e D1/D5 dopaminérgicos prejudica o efeito da novidade, promovendo a generalização da memória aversiva. Além disso, vimos em nosso estudo que a exposição à novidade aumenta os níveis de noradrenalina e dopamina no hipocampo, sugerindo que, de fato, o aumento desses

neurotransmissores pode influenciar a promoção de LTM observada no teste de retenção na EM.

O conhecimento acerca do envolvimento de dois sistemas neurotransmissores sobre a novidade e sua importância para a discriminação da memória e prevenção da generalização da memória aversiva pode auxiliar no futuro à novas pesquisas para aplicabilidade terapêutica em transtornos psiquiátricos, como o TEPT.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que o efeito modulatório da novidade sobre a generalização da memória aversiva depende da ativação do sistema β -adrenérgico e dopaminérgico hipocampal e, além disso, que a exposição à novidade aumenta os níveis de noradrenalina e dopamina na região CA1 do hipocampo de ratos *Wistar* 30 minutos após este evento.

REFERÊNCIAS

- Ballarini, F., Moncada, D., Martinez, M., Alen, N., Viola, H. (2009). Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. **PNAS**, 106 (34), 14599–14604.
- Bunzeck, N., Düzel, E. (2006). Absolute coding of stimulus novelty in the human substantia nigra/VTA. **Neuron** 51, 369–379.
- Costanzi, M., Cannas, S., Saraulli, D., Rossi-Arnaud, C., Cestari, V. (2011) Extinction after retrieval: Effects on the associative and nonassociative components of remote contextual fear memory. **Cold Spring Harbor Laboratory Press** 18, 508-518.
- Frey, U., Morris, R. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. **Nature**, 385 (6), 533–536.
- Huckleberry, K., Ferguson, L., Drew, M. (2016). Behavioral mechanisms of context fear generalization in mice. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 23, 703-709.
- Jasnow, A., Lynch III, J., Gilman, T., Riccio, D. (2016). Perspectives on Fear Generalization and Its Implications for Emotional Disorders. **Journal of Neuroscience Research** 00, 1-15.
- Li, S., Cullen, W., Anwyl, R., Rowan, M. (2003). Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. **Nature Neuroscience**, 6 (5), 526–531.
- Menezes, J., Alves, N., Borges, S., Roehrs, R., Myskiw, J. C., Furini, C. R. G., Izquierdo, I., Mello-Carpes, P. B. (2015) Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus. **PNAS**, 1652-1658.
- Moncada, D. (2016). Evidence of VTA and LC control of protein synthesis required for the behavioral tagging process. **Neurobiology of Learning and Memory**.
- Moncada, D., Ballarini, F., Martinez, M., Frey, J., Viola, H. (2011). Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. **PNAS**, 108 (31), 12931-12936.
- Moncada, D., Ballarini, F., Viola, H. (2015). Behavioral tagging: a translation of the synaptic tagging and capture hypothesis. **Neural Plasticity**, 2015, 1-6.
- Moncada, D., Viola, H. (2007). Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: Evidence for a behavioral tagging. **Journal of Neuroscience**, 27 (28), 7476–7481.
- Onat, S., Büchel, C. (2015). The neuronal basis of fear generalization in humans. **Nature neuroscience**, 18, 1811-1821.
- Vargas, L., Sevenster, D., Lima, K., Izquierdo, I., D'Hooge, R., Mello-Carpes, P. (2018) Novelty exposure avoids aversive memory generalization, and its effect depends on hippocampal protein synthesis. Submitted to **Behavioral Brain Research**.