

A EXPOSIÇÃO À NOVIDADE EVITA GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA, EFEITO DEPENDENTE DE SÍNTESE PROTEICA HIPOCAMPAL

Ana Carolina de Souza da Rosa¹

Ana Carolina Rosa²

Karine Lima³

Pâmela Billig Mello Carpes⁴

Liane Vargas⁵

Resumo:

A generalização do medo é definida como a transferência do medo experimentado durante um evento traumático para condições seguras que se assemelham ou não ao evento traumático, e tem sido relacionada a vários distúrbios psicológicos, como Transtorno do Estresse Pós-traumático (TEPT). Aqui, o objetivo foi investigar se a exposição de novidade pode ser eficaz para evitar a generalização do medo. Foi avaliado o efeito de uma exposição à novidade na generalização da memória de medo usando a tarefa de memória aversiva, a esquia inibitória (EI). Ratos Wistar machos foram treinados na EI (dia 1) e 24h após (dia 2) foram expostos a uma esquia inibitória modificada (EIM), um ambiente inerte, com alguns ratos sendo expostos a uma novidade pouco antes da exposição a EIM (grupo novidade), enquanto outros não (grupo controle). No dia 3, foram realizados testes de retenção na EI ou na EIM. O grupo controle generalizou a memória, expressando comportamento aversivo em ambos os contextos, enquanto o grupo novidade expressou apenas aversão na EI. O efeito da novidade evitando a generalização foi bloqueado quando os animais do grupo novidade receberam a infusão intrahipocampal de anisomicina (inibidor da síntese proteica ribossomal) ou rapamicina (inibidor da síntese proteica mediada por mTOR), imediatamente após a exposição à novidade. Assim, concluiu-se que a exposição à novidade evita a generalização da memória aversiva, efeito este que depende da síntese proteica do hipocampo.

Palavras-chave: generalização do medo, novo contexto, hipocampo, anisomicina, rapamicina.

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

**A EXPOSIÇÃO À NOVIDADE EVITA GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA, EFEITO
DEPENDENTE DE SÍNTESE PROTEICA HIPOCAMPAL**

¹ Aluno de graduação. aninhadarosa99@gmail.com. Autor principal

² Aluno de graduação. aninhadarosa99@gmail.com. Apresentador

³ Aluno de Graduação. karinelima96@gmail.com. Co-autor

⁴ Docente. pamelacarpes@unipampa.edu.br. Orientador

⁵ Aluno de Pós-Graduação. lianeevargas@gmail.com. Co-orientador

A EXPOSIÇÃO À NOVIDADE EVITA GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA, EFEITO DEPENDENTE DE SÍNTESE PROTEICA HIPOCAMPAL

1 INTRODUÇÃO

Quando estamos expostos a uma situação aversiva, que pode ser fatal, o medo é a resposta adaptativa normal e esperada, indispensável para prevenir situações prejudiciais (SHALEV, LIBERZON et al., 2017). No entanto, o medo deve ser expresso apenas em momentos específicos, caso contrário, pode ter um impacto negativo na vida diária.

O Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) é um transtorno psiquiátrico que ocorre em condições de medo intenso (REYNOLDS E BREWIN, 1998). No TEPT, respostas de medo generalizadas intensas e persistentes são frequentemente evocadas por contextos não aversivos que, embora diferentes, se assemelham às condições do evento traumático original (HAYES, HAYES et al., 2012, PARSONS E RESSLER, 2013).

A generalização é descrita como uma incapacidade de discriminar diferentes estímulos, como por exemplo, um estímulo neutro e outro perigoso. Assim, dependendo da extensão da generalização, ela pode levar a respostas fisiológicas e comportamentais inadequadas. Com isso, torna-se necessário o desenvolvimento ou aprimoramento de estratégias de tratamento, uma vez que as terapias farmacológica e psicológica disponíveis oferecem algum alívio, mas têm várias limitações importantes (BERGER, MENDLOWICZ et al. 2009, POWERS, HALPERN et al. 2010).

Estudos prévios demonstraram que a exposição à novidade facilita a aprendizagem (MYSKIW et al., 2013; MENEZES et al., 2015), através de mecanismos que induzem a síntese de proteínas no hipocampo (CASSINI, 2013). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar se a exposição a novidade pode ser uma estratégia eficaz para modular ou impedir a generalização da memória de medo.

2 METODOLOGIA

Para este estudo foram utilizados 120 ratos Wistar machos, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (RS/Brasil). Este estudo foi desenvolvido em duas etapas, conforme descrito a seguir:

Etapla 1: Efeitos da novidade na generalização da memória: 40 ratos foram divididos em 2 grupos: (1) Controle (n = 20) e (2) Novidade (n = 20). Os procedimentos foram conduzidos durante três dias: No dia 1 todos os animais foram treinados em Esquiva Inibitória (EI); no dia 2 todos os animais foram submetidos a exposição a Esquiva Inibitória Modificada (EIM), sendo permitida a exploração da mesma por 3 min, entretanto, o grupo novidade foi exposto à novidade (um campo aberto desconhecido) para livre exploração durante 5 min, 30 min antes da exposição à EIM; no dia 3 metade dos animais de cada grupo foram testados na EI e a outra metade na EIM.

Etapla 2: A síntese protéica hipocacampal é necessária para o efeito da novidade na generalização da memória: 80 ratos foram divididos em 4 grupos: (1) Controle (n = 20), (2) Novidade + Veículo (n = 20), (3) Novidade + Anisomicina (n = 20), (4) Novidade + Rapamicina (n = 20). Os procedimentos foram realizados em três dias: No dia 1 todos os animais foram treinados na EI; no dia 2 todos os animais foram submetidos a exploração da EIM por 3 minutos, porém os grupos 2, 3 e 4 foram expostos ao ambiente novo (um campo aberto desconhecido) por 5 min, 30 min antes da EIM e, imediatamente após foi realizada a infusão intrahipocampal de veículo (no grupo 2), anisomicina – inibidor da síntese protéica ribossomal (no grupo 3) e,

rapamicina, inibitor da síntese proteica mediada por Mtor (no grupo 4); no dia 3 metade dos animais de cada grupo foi submetida ao teste de retenção na EI e outra metade na EIM.

Protocolos:

Tarefa de Esquiva Inibitória (EI): O aparato de EI consiste de uma caixa 50,0 x 25,0 x 50,0 cm, com a parte frontal feita de acrílico, assoalho formado por barras de bronze paralelas, contendo ao lado esquerdo da caixa uma plataforma de 5,0 cm de altura por 7,0 cm de largura. Durante a sessão de treino (dia 1), todos os animais foram individualmente colocados sobre a plataforma elevada da EI. Ao descer da plataforma e colocar as quatro patas na grade de barras de bronze eletrificáveis para explorar o ambiente, os animais receberam um estímulo elétrico de 0,7 mA por 2s, sendo imediatamente recolocados em suas caixas de moradia. Este treino serve como uma sessão de aprendizagem, para indução da formação de uma memória aversiva.

Exposição à novidade: Durante a exposição à novidade (dia 2), os animais dos grupos 2, 3 e 4 foram colocados individualmente em um campo aberto. Basicamente, o rato foi colocado em um ambiente novo, uma caixa de madeira aberta de 50 x 50 x 60 cm, pintada de branco, com uma parede de vidro frontal. Os ratos foram movidos individualmente da gaiola para o campo, onde foram deixados a explorar livremente por 5 minutos.

Tarefa de Esquiva Inibitória Modificada (EIM): Posteriormente, todos os animais foram submetidos a exploração da EIM durante 3 minutos. A EIM continha algumas diferenças em relação à EI utilizada no treino: adicionou-se um assoalho preto, listras pretas nas paredes, aroma e luz vermelha no ambiente; eliminou-se o estímulo elétrico. Este aparelho foi utilizado para verificar a ocorrência ou não de generalização da memória aversiva.

Teste de retenção: O teste de retenção (dia 3) foi realizado para verificar a retenção da memória da EI e da EIM. Consistiu em colocar o animal na EI ou na EIM e contabilizar a latência de descida da plataforma.

Cirurgia estereotáxica: Para o segundo conjunto de experimentos implantaram-se cânulas na região CA1 do hipocampo dos animais sob anestesia profunda com cetamina e xilazina (i.p., 75 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente). As cânulas são tubos de aço inoxidável de calibre 27, estereotaxicamente direcionados para a região CA1 do hipocampo dorsal (A, -4,2; L, $\pm$ 3,0 e V, -2,0 mm) [coordenadas de acordo com PAXINOS E WATSON (1986)]. As cânulas foram afixadas com cimento dentário. Os animais foram monitorados para recuperação da cirurgia por 4 dias antes de serem submetidos a qualquer outro procedimento.

Análise Estatística: O teste de Wilcoxon foi usado para comparar os resultados intragrupo (treino na EI x teste de retenção). A ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida pelo post-hoc de Dunn, foi usada para a comparação dos resultados do teste entre os grupos.

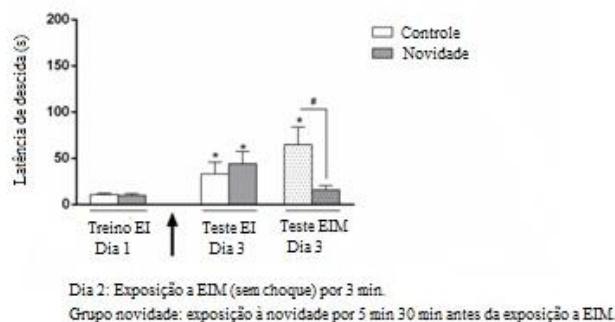
Aspectos éticos: Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (protocolo 001/2017).

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Na etapa 1 deste estudo verificamos que a exposição a novidade evita a generalização da memória aversiva. No teste na EI (dia 3) ambos os grupos tiveram tempos de latências alta ($P=0,004$ e $P=0,04$, grupo controle e novidade, respectivamente). Entretanto, quando testados na EIM (dia 3) somente o grupo controle manteve a latência alta ($P=0,001$), enquanto que o

grupo novidade desceu rapidamente da plataforma ($P = 0,47$), portanto, os animais controle apresentaram generalização da memória aversiva, enquanto a novidade evitou a generalização, conforme pode ser visto na figura 1. * $P \leq 0,05$ no teste de Wilcoxon (treinamento vs. teste); # $P \leq 0,05$ no teste U de Mann-Whitney (comparações entre os grupos).

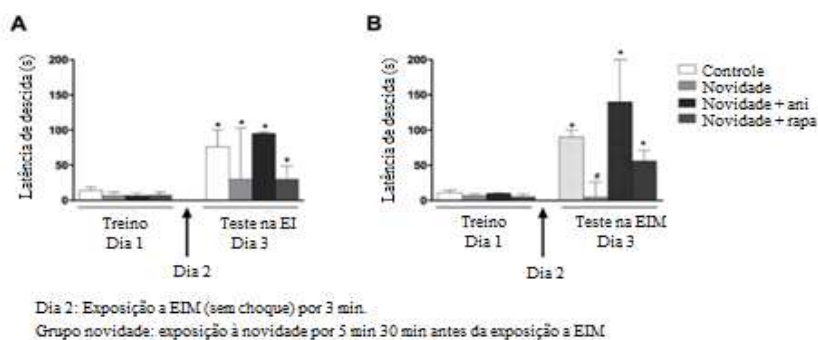
Figura 1 – A exposição à novidade evita a generalização da memória ($n = 10/\text{grupo}$).



Fonte: do autor, 2018.

Na etapa 2 deste estudo verificamos que os efeitos da novidade na generalização da memória dependem da síntese protéica no hipocampo. No teste realizado na EI, todos os grupos apresentaram maior latência no teste em comparação com o treino ($P=0,007$ para o grupo controle; $P=0,01$ para o grupo novidade; $P=0,03$ para o grupo novidade + Anisomicina (Ani); $P=0,03$ para o grupo novidade + Rapamicina (Rapa) - Figura 2A). Quando testados na EIM, somente o grupo novidade não mostrou diferenças entre o tempo de descida do treino e do teste ($P = 0,33$), demonstrando que a novidade evitou a generalização. No entanto, quando estes animais expostos à novidade receberam a infusão de Anisomicina ou Rapamicina, inibidores da síntese protéica, a generalização da memória ocorre, o que indica a necessidade de síntese protéica hipocampal para o efeito da novidade ($P = 0,01$ e $P = 0,01$, grupo novidade + Ani e novidade + Rapa, respectivamente); * $P \leq 0,05$ no teste de Wilcoxon (treinamento vs. teste); # $P \leq 0,05$ em ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de post-hoc de Dunn. (Figura 2 B).

Figura 2 – O efeito da novidade na generalização da memória depende de síntese protéica hipocampal. ($n = 10/\text{grupo}$)



Fonte: do autor, 2018.

Nossos resultados demonstraram que os animais que não foram expostos a novidade, generalizaram a memória aversiva, apresentando uma maior latência comparados com os animais expostos ao ambiente novo. LOPRESTO E SCHIPPER, et al. (2016) afirmam que a

generalização das respostas de medo a contextos que podem ser semelhantes, mas não igualmente perigosos como aquele em que a memória aversiva foi adquirida, pode levar a um comportamento patológico de medo e esquivas. Essas situações podem ocorrer em transtornos que envolvem medo intenso (como TEPT), quando a memória do medo é involuntária evocada por situações inespecíficas ou contextos que se assemelham ao evento traumático original (LISSEK 2012, LOPRESTO, SCHIPPER et al. 2016).

Também foi apresentado nos nossos resultados que, a exposição a um ambiente novo (novidade), além de impedir a generalização da memória aversiva, depende da síntese proteica do hipocampo, uma vez que a infusão de inibidores de proteínas na região CA1 do hipocampo bloqueou os efeitos da novidade. Assim, a novidade pode ser vista como uma possível estratégia terapêutica para transtornos de medo, e a sua dependência de síntese de proteínas é consistente com estudos anteriores. Por exemplo, a infusão de anisomicina na região CA1 do hipocampo dorsal impediu o efeito da novidade na melhoria da formação da memória de longa duração (MONCADA E VIOLA, 2007). Da mesma forma, a facilitação da extinção por novidade requereu a síntese de proteínas, tanto no condicionamento do medo quanto nas tarefas de esquivas inibitória (DE CARVALHO MYSKIW, FURINI ET AL, 2014). A novidade parece fornecer a expressão de proteínas relacionadas à plasticidade (PRPs), proteínas estas que podem estabilizar um traço de memória fraca, neste caso a exposição à EIM (MORRIS, 2006), permitindo que os animais consigam discriminar entre dois ambientes similares, porém com níveis de perigo distintos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados demonstram que a exposição à novidade evita a generalização da memória e, que, notavelmente, o efeito da novidade mostrou depender da síntese de proteína hipocampal. Assim, esse estudo pode ser relevante para a aplicabilidade terapêutica da exposição à novidade em transtornos do medo.

REFERÊNCIAS

- BERGER, W., M. V. MENDLOWICZ, C. MARQUES-PORTELLA, G. KINRYS, L.F. FONTENELLE, C. R. MARMAR E I. FIGUEIRA. "Alternativas farmacológicas aos antidepressivos no transtorno de estresse pós-traumático: uma revisão sistemática". **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry** 33 (2): p. 169-180, 2009.
- CASSINI, L. F. I. Influência da reconsolidação de uma memória aversiva sobre um novo aprendizado concomitante e mais fraco. Dissertação de mestrado ao programa de pós-graduação em Neurociência, Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.
- DE CARVALHO MYSKIW, J., C. R. FURINI, F. BENETTI E I. IZQUIERDO. "Mecanismos moleculares do hipocampo envolvidos no aumento da extinção do medo causado pela exposição à novidade." **PNAS** 111 (12): p. 4572-4577, 2014.
- FURINI, C., J. MYSKIW E I. IZQUIERDO. "O aprendizado da extinção do medo". **Neuroscience & Biobehaviour Reviews** 47: p. 670-683, 2014.
- HAYES, J. P., S. M. HAYES E A. M. MIKEDIS. "Metanálise quantitativa da atividade neural no transtorno de estresse pós-traumático". **Biology of Mood & Anxiety Disorders** p.2: 9, 2012.
- HEIM, C. E C. B. NEMEROFF. "Neurobiologia do transtorno de estresse pós-traumático". **CNS Spectrums** 14 (1 Supl 1): p. 13-24, 2009.
- LISSEK, S. "Rumo a um relato de ansiedade clínica baseado em mecanismos básicos, neuralmente mapeados, do aprendizado de medo pavloviano: o caso da supergeneralização condicionada". **Depression and Anxiety** 29 (4): p. 257-263, 2012.

LOPRESTO, D., P. SCHIPPER E J. R. HOMBERG. "Circuitos neurais e mecanismos envolvidos na generalização do medo: Implicações para a fisiopatologia e tratamento do transtorno de estresse pós-traumático." **Neuroscience Biobehavioral Rev** 60: p. 31-42, 2016.

LUYTEN, L., N. SCHROYENS, K. LUYCK, M. S. FANSELOW E T. BECKERS. "Nenhum efeito da administração de glicose em um novo protocolo de generalização do medo contextual em ratos." **Translational Psiquiatria** 6 (9): p. e903, 2016.

MENEZES, J. N. ALVES, S. BORGES, R. ROEHRS, J. DE CARVALHO MYSKIW, C. R. FURINI, I. IZQUIERDO E P. B. MELLO-CARPES. "A facilitação da extinção do medo pela novidade depende da ação da dopamina nos receptores de dopamina do subtipo D1 no hipocampo". **PNAS** 112 (13): p. E1652-1658, 2015.

MILAD, M. R., C. I. WRIGHT, S. P. ORR, R. K. PITMAN, G. J. QUIRK E S. L. RAUCH. "recordar da extinção do medo em humanos ativa o córtex pré-frontal ventromedial e hipocampo em concerto." **Biological Psychiatry** 62 (5): p. 446-454, 2007.

MYSKIW, J. C., BENETTI, F., IZQUIERDO, I. Etiquetagem comportamental da aprendizagem de extinção. **PNAS**, vol. 110, no.3, p. 1071-1076, jan., 2013.

MONCADA, D. E H. VIOLA. "A indução da memória de longo prazo pela exposição à novidade requer síntese proteica: evidência de uma marcação comportamental". **Journal Neuroscience** 27 (28): p. 7476-7481, 2007.

MORRIS, R. G. "Elementos de uma teoria neurobiológica da função hipocampal: o papel da plasticidade sináptica, marcação sináptica e esquemas." **Europe Journal Neuroscience** 23 (11): p. 2829-2846, 2006.

PARSONS, R. G. E K. J. RESSLER. "Implicações da modulação de memória para estresse pós-traumático e distúrbios do medo". **Nature Neuroscience** 16 (2): p. 146-153, 2013.

PAXINOS, G., WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney, Orlando: **Academic Press**, 2ª ed, (1986).

POWERS, M. B., J. M. HALPERN, M. P. FERENSCHAK, S.J. GILLIHAN E E. B. FOA. "Uma revisão meta-analítica de exposição prolongada para transtorno de estresse pós-traumático". **Clinical Psychology Review** 30 (6): p. 635-641, 2010.

REYNOLDS, M. E C. R. BREWIN. "Cognições intrusivas, estratégias de enfrentamento e respostas emocionais na depressão, transtorno de estresse pós-traumático e uma população não clínica". **Behaviour Research Therapy** 36 (2): p. 135-147, 1998.

SHALEV, A., I. LIBERZON E C. MARMAR. "Transtorno de Estresse Pós-Traumático". **The New England Journal of Medicine** 376 (25): p. 2459-2469, 2017.