

EFEITO DA NOVIDADE NA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA AVERSIVA

Steffanie Picua¹

Steffanie Severo Picua²

Pamela Billig Mello Carpes³

Niege Alves⁴

Resumo:

Introdução: a extinção se deve à desvinculação do estímulo condicionado do estímulo incondicionado com o qual tinha se associado e gerado uma resposta aprendida. O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é um distúrbio caracterizado pela revivência através das lembranças recorrentes de alguma situação traumática que se viveu ou testemunhou, na clínica, a extinção é aplicada na terapia de exposição. O objetivo do estudo foi avaliar a persistência da extinção da memória aversiva facilitada pela exposição à novidade, bem como, compreender melhor os mecanismos fisiológicos envolvidos no processo. **Metodologia:** Para este estudo foram usados 37 ratos Wistar machos, estes foram divididos em cinco grupos: (i) Grupo controle: ratos foram treinados evitação inibitória (IA), uma tarefa comportamental aversiva e, 24 horas depois, submetidos a três sessões de treinamento de extinção com intervalo de 90 min entre sessões. 24 horas, 3, 7, 14 e 21 dias após os ratos terem sido submetidos a uma retenção; (ii) Novo grupo exposto a OF: ratos foram submetidos aos mesmos procedimentos que o grupo (i), e 30 minutos antes da primeira sessão de extinção, foram expostos a uma novidade campo aberto desconhecido por 5 min; (iii) grupo familiar exposto a OF: ratos foram submetidos a os mesmos procedimentos que grupo (ii), exceto que o campo aberto não era desconhecido, porque eles foram previamente expostos a ele; (iv) Grupo dopamina: ratos foram submetidos ao mesmo procedimentos que agrupam (i), e 30 minutos antes da primeira sessão de extinção que receberam uma microinjeção intra-hipocampal de dopamina; (v) grupo dopamina + familiar: ratos foram submetidos aos mesmos procedimentos que o grupo (iii) e, adicionalmente, recebeu uma microinjeção intra-hipocampal de dopamina. Experimentos de controle foram feitos para verificar a ansiedade, sensibilidade periférica e comportamento motor. **Resultados e discussão:** observou-se que a latência de descida da plataforma dos grupos (ii) novidade, (iv) dopamina e (v) familiar + dopamina foi significativamente menor que nos grupos (i) controle e (iii) familiar em todos os testes de retenção. Os resultados permitem afirmar que a modulação da memória aversiva pela novidade tem efeitos persistentes, e que estes são mimetizados pela infusão de dopamina. **Considerações finais:** Estes achados são de grande aplicabilidade terapêutica para o tratamento de fobias como o TEPT. Portanto, associar esta terapia com a exposição à novidade ou administração de fármacos precursores de dopamina pode ser uma estratégia eficaz no tratamento destes

pacientes. Este trabalho foi aceito CEUA nº 018/2017 Unipampa/RS.

Palavras-chave: TEPT , dopamina, exposição

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

EFEITO DA NOVIDADE NA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA AVERSIVA

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

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

³ Docente. pamelacarpes@unipampa.edu.br. Orientador

⁴ Aluna da pós-graduação. niege.gpfis@gmail.com. Co-orientador

A MODULAÇÃO DA EXTINÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA PELA NOVIDADE TEM EFEITOS PERSISTENTES MIMETIZADOS PELA INFUSÃO DE DOPAMINA HIPOCAMPAL

1 INTRODUÇÃO

O transtorno de estresse pós-traumático (TETP) é um distúrbio caracterizado pela revivescência através das lembranças recorrentes de alguma situação traumática que se viveu ou testemunhou, sendo frequente em pessoas que participaram de guerras, sofreram ou testemunharam violência sexual ou física, acidentes entre outros (FIGUEIRA et al., 2003).

As revivescências podem se apresentar sob diversas formas: sonhos vívidos, pesadelos, pensamentos ou sentimentos incontroláveis, flashbacks. O paciente queixa-se de pensamentos, imagens, sentimentos e comportamentos recorrentes relacionados ao evento traumático. Os sintomas do TETP são facilmente observáveis e incluem a irritabilidade, taquicardia, insônia, sobressalto excessivo e hipervigilância. Mesmo que o paciente controle os efeitos das revivescências por meio do entorpecimento emocional, seu corpo pode ter uma reação exacerbada diante de estímulos externos como se estivesse sentindo-se ameaçado (FIGUEIRA et al., 2003).

A extinção da memória aversiva, que consiste na diminuição da probabilidade de evocação de uma memória traumática, (MYSKIW et al., 2013), é uma terapia comumente utilizada como intervenção clínica no tratamento de fobias como o TEPT. Na clínica, a extinção é aplicada na terapia de exposição.

Estudos recentes do nosso e de outros grupos mostraram que a exposição a uma novidade (ambiente novo), aumenta os níveis de dopamina no hipocampo e facilita a extinção de memórias aversivas efeitos estes que provavelmente se baseia na marcação e captura sináptica e depende dos receptores dopaminérgicos do tipo D1 do hipocampo (MENEZES et al, 2015; MYSKIW et al., 2013).

Embora se saiba do efeito da novidade na facilitação da extinção e do envolvimento do sistema dopaminérgico, não se estudou até então a persistência deste efeito. O presente estudo tem como objetivo avaliar a persistência da extinção da memória aversiva facilitada pela exposição à novidade, bem como compreender melhor os mecanismos dopaminérgicos envolvidos no efeito da novidade na extinção da memória.

2 METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizados 37 ratos Wistar machos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os animais foram alojados em caixas plásticas especiais forradas com maravalha, com capacidade para 4 animais, em condições controladas de luz (ciclo 12 horas claro/escuro) e temperatura (21-23°C), recebendo água e ração ad libitum. Os mesmos foram divididos aleatoriamente em 5 grupos:

- (i) *Grupo controle*
- (ii) *Grupo novidade – exposição a um ambiente novo*
- (iii) *Grupo ambiente familiar – exposição a um ambiente familiar*
- (iv) *Grupo dopamina – infusão hipocampal de dopamina exógena*
- (v) *Grupo ambiente familiar + dopamina exógena*

No grupo (i) os animais foram treinados no aparato de EI (Esquiva Inibitória), que consiste em uma tarefa de memória aversiva, e 24 horas mais tarde submetidos a 3 (três) sessões de

extinção com intervalos de 90 min entre as sessões. Vinte e quatro horas depois, estes animais passaram pela primeira sessão de retenção (teste para medir a retenção da memória de extinção), que ocorreu também 3, 7, 14 e 21 dias após a última sessão de extinção para verificar a persistência da extinção. O grupo (ii) foi treinado na EI, e, 30 min antes da primeira sessão de extinção, os animais foram expostos à novidade (ambiente novo – campo aberto nunca antes explorado) e posteriormente passaram pelos mesmos procedimentos do grupo controle. O grupo (iii) foi exposto ao campo aberto 24 horas antes do treino na EI, para que este ambiente se tornasse familiar ao animal. No dia seguinte, os animais desse grupo passaram pelo treino na EI, e, 30 min antes da primeira sessão de extinção (que ocorreu 24 após o treino), foram novamente expostos ao campo aberto (já familiar) durante 5 min, assim, isolando o efeito da exposição ao campo aberto do efeito da exposição à novidade. Posteriormente, seguiram-se as sessões de extinção e retenção. O grupo (iv) foi treinado na EI, e, 30 min antes da primeira sessão de extinção, os animais receberam uma microinjeção intrahipocampal de dopamina exógena e posteriormente passaram pelas sessões de extinção (3 sessões) e retenção no 1º, 3º, 7º, 14º e 21º dia após a extinção, para verificar se a dopamina teria o mesmo efeito da novidade. Por fim, o grupo (v), da mesma forma que o grupo (iii) foi exposto 24 horas antes da primeira sessão de treino na EI ao campo aberto. No dia seguinte, os animais desse grupo passaram pelo treino na EI, e, 30 min antes da primeira sessão de extinção (que ocorreu 24 após o treino), eles foram novamente expostos ao campo aberto (já familiar) durante 5 min e imediatamente após receberam uma microinjeção intrahipocampal de dopamina exógena. Posteriormente, seguiram as sessões de extinção e retenção. Este trabalho foi aceito CEUA nº 018/2017 Unipampa/RS.

DROGAS, PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E MICROINJEÇÃO

O fármaco utilizado neste estudo foi a dopamina, proveniente da Sigma- Aldrich (St Louis, MO, USA). A dosagem utilizada foi determinada a partir de estudos pilotos. Os animais foram anestesiados com Xilazina (10 mg/ml) e ketamina (100 mg/ml;). Logo após a anestesia, foi realizada a cirurgia estereotáxica para implantação das cânulas bilateralmente no hipocampo a partir das coordenadas do Atlas Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2009).

TESTES COMPORTAMENTAIS

1. Esquiva inibitória (EI)

Para formar a memória aversiva os ratos foram colocados individualmente aparato de EI, que consiste em uma caixa de 50,0 x 25,0 x 50,0 cm, com a parte frontal feita de acrílico. O assoalho do aparelho é formado por barras de bronze paralelas e há uma plataforma no canto da caixa. Primeiramente os animais foram treinados na EI. O treino consiste em colocar o animal cuidadosamente sobre a plataforma elevada e quando ele desce desta e coloca as quatro patas na grade de barras de bronze eletrificáveis, recebe um choque elétrico de 0,5 mA por 2s (CAMMAROTA et al., 2003) sendo imediatamente recolocado na sua caixa-moradia. No dia seguinte (24 horas após o treino) foram iniciadas as sessões de extinção, quando os animais foram colocados novamente na plataforma, porém ao descer eles tiveram a permissão para explorar livremente todo o aparato durante 300 segundos sem choque nas patas. Essa sessão de extinção foi repetida 3 vezes com intervalos de 90 minutos (24-27 horas depois do treinamento na EI). 24 horas mais tarde (3º dia) foi realizada a primeira sessão de retenção, que ocorreu também no 3º, 7º, 14º, 21º dia após a extinção. Nas sessões de retenção a latência de descida do animal da plataforma foi verificada através de um cronômetro. Cabe ressaltar que o aparato passou por uma limpeza com álcool 70% antes da entrada de cada animal, para evitar pistas odoríferas.

2. Campo Aberto (CA) – novidade

O aparato de CA consiste em uma caixa madeira branca 50×50×60 cm com uma parede de vidro frontal. Os animais (g: iii, g: v) foram colocados neste aparato 1 dia antes do Treino na EI, e exploraram o campo livremente durante 30 min. No 2º dia, 30 min antes da primeira sessão de extinção, os animais dos grupos iii e v novamente foram colocados no aparato, assim como os animais do grupo ii, para livre exploração por 5 min. Após isso, foram cuidadosamente retirados do campo e colocados na EI para início da primeira sessão de extinção.

TESTES DE CONTROLE COMPORTAMENTAL

Foram realizados os seguintes testes de controle comportamental:

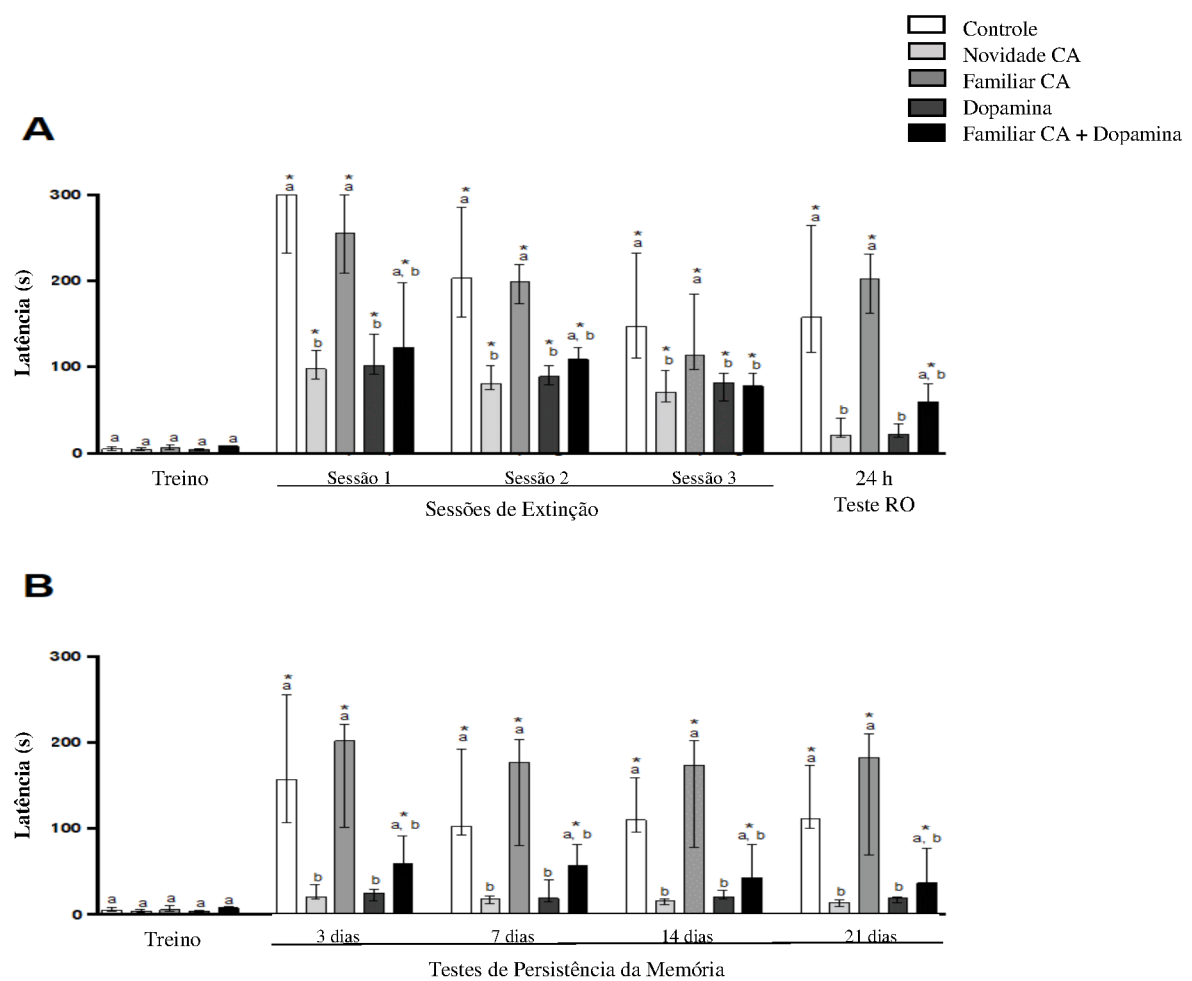
- *O Labirinto em Cruz Elevado (LCE)*: utilizado para avaliar o estado de ansiedade dos animais.
- *Campo aberto*: Para analisar atividades exploratórias e locomotoras e garantir que a infusão de drogas ou outros procedimentos não prejudicassem tais comportamentos.
- *Placa quente*: foi utilizado para assegurar-se sobre a preservação da sensibilidade álgica preservada (BEVILAQUA et al., 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Podemos observar que a latência de descida da plataforma dos grupos (ii) novidade, (iv) dopamina e (v) familiar + dopamina foi significativamente menor que nos grupos (i) controle e (iii) familiar em todos os testes de retenção (Figura 1 A e B). Tais resultados permitem afirmar que a modulação da memória aversiva pela novidade tem efeitos persistentes, e que estes são mimetizados pela infusão de dopamina. Adicionalmente, verifica-se que o efeito é dependente da novidade, e não do campo aberto em si, já que esse efeito não é visto nos animais que são expostos a um já familiar.

Corroborando com nossos resultados estudos recentes observaram que a memória de curto prazo inicial é sustentado por uma mudança de plasticidade transitória nas sinapses ativadas e define marcas sinápticas, essas marcas, chamadas por tags, são mais tarde capazes de capturar e processar os PRPs - proteínas relacionadas a plasticidade, que são necessários para transformar uma mudança sináptica de curto prazo em uma mudança de longo prazo (MYSKIW et.al., 2013). Sabendo que os mecanismos da extinção são semelhantes aos da formação de memórias, mas, em vez de resultar num aumento das respostas aprendidas, resultam numa diminuição da possibilidade de sua expressão (IZQUIERDO et al., 2013), a novidade previamente a uma sessão de extinção melhora este processo.

Fig. 1. A. Houve diferença entre os grupos no teste de retenção 24 horas ($P = 0,02$), como também em B nos testes de 3, 7, 14 e 21 dias ($P < 0,0001$ para todos os dias de teste). Os animais do grupo novidade (ii), dopamina (iv) e familiar + dopamina (v) apresentaram menores latências no IA, ou seja, demonstraram extinção da memória aversiva. Já os animais do grupo controle (i) e familiar (iii) apresentaram latências mais elevadas, isto é, não extinguíram a memória aversiva.



Nem a exposição à dopamina nem a novidade afetaram o desempenho dos animais nos testes LEC, PQ e CA. Os dados são expressos como média $\pm$ SD do número de cruzamentos e levantamentos (OF), o tempo gasto e o número de entradas nos braços abertos (PM) e latência de tempo (TF). Não houve diferenças entre os grupos (ANOVA; $N = 7-9$).

Tabela 1. Os protocolos adotados e a infusão de dopamina não alteraram o comportamento locomotor e exploratório, a ansiedade e a sensibilidade

Teste de controle comportamental	Grupos				
	Controle	Novidade	Dopamina	Familiar	Dopamina+familiar
Labirinto-braços ab	121.9 $\pm$ 20.43	125.1 $\pm$ 30.88	140.0 $\pm$ 19.25	140.6 $\pm$ 45.69	134. $\pm$ 30.66
Labirinto-braços fechados	126 $\pm$ 17.41	170.3 $\pm$ 31.18	160.0 $\pm$ 19.25	159.4 $\pm$ 45.69	165.9 $\pm$ 30.66
Placa quente	1.787 $\pm$ 6.7	1.345 $\pm$ 6.8	2.160 $\pm$ 6.0	2.573 $\pm$ 6.5	2.116 $\pm$ 6.8
Campo aberto-cruzamentos	13.37 $\pm$ 50.33	8.519 $\pm$ 43. 71	9.118 $\pm$ 40.14	10.69 $\pm$ 53.29	10.40 $\pm$ 53.86
Campo aberto-elevações	7.906 $\pm$ 24.33	4.706 $\pm$ 16.66	4.392 $\pm$ 16.43	4.309 $\pm$ 22.29	3.402 $\pm$ 16.29

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados permitem verificar que a exposição à novidade promove a extinção da memória aversiva e que este efeito é persistente e mimetizado pela infusão de dopamina no hipocampo. Estes achados são de grande aplicabilidade terapêutica para o tratamento do transtorno de estresse pós-traumático, que vem sendo tratado com terapia de exposição, processo análogo à extinção, mas com pouco efetividade. Assim, aliar esta terapia com a exposição à novidade ou administração de fármacos precursores de dopamina pode ser uma estratégia eficaz no tratamento destes pacientes.

5 REFERÊNCIAS

BEVILAQUA LR, ROSSATO JI, MEDINA JH, IZQUIERDO I, CAMMAROTA M. **Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall.** Behavioral and Pharmacology. 14: pp. 649-652,2003.

CAMMAROTA M, BEVILAQUA LR, KERR D, MEDINA JH, IZQUIERDO I. **Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstallation of an extinguished conditioned fear response.** Eur J Neurosci.23: 737-741, 2003.

FIGUEIRA, Ivan; MENDLOWICZ, Mauro. **Diagnóstico do transtorno de estresse pós-traumático.** Rev. Bras. Psiquiatr., São Paulo, v. 25, supl. 1, p. 12-16, June 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516444622003000500004&lng=en&nrm=iso.> Acesso em 28 de ago. 2018.

IZQUIERDO, I.; MYSKIW, J. C.; BENETTI F.; FURINI, C. R. **Memória: tipos e mecanismos – achados recentes.** Revista USP, São Paulo, n. 98, p. 9-16, junho/julho/agosto 2013. Disponível em: < www.revistas.usp.br > Início > Arquivos > n. 98 (2013): Memória >. Acesso em 30 de ago. de 2018.

MENEZES, J. , ALVES, N. , BORGES, S. , ROEHRS, R. , MYSKIW,J. , FURINI, C. , IZQUIERDO,I. , MELLO-CARPES, P. **Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus.** Rev. PNAS, Porto Alegre, 2015.

MYSKIW, J. C.; BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. **“Behavioral Tagging of Extinction Learning”, in Proceedings of the National Academy of Sciences.** USA, 110, pp. 1.071-6,2013.