

Filipe Mello Medeiros

Memória traumática resistente à extinção, comportamento sensório-motor da marcha e histofisiologia da amígdala medial: uma análise integrativa em um modelo murino.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Régis Gemerascá Mestriner

Porto Alegre, RS

2016

Dedico este trabalho à minha família: Sésiom, Kátia, Thaís e minha esposa Paula.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Sésiom Medeiros da Silva e Kátia Regina da Silva Mello, pelos valores que me foram ensinados e por tudo que sempre fizeram por mim, incondicionalmente. Todas as palavras do mundo seriam pouco para expressar o tamanho da minha gratidão. Amo vocês.

À minha esposa Paula Azambuja Codorniz por todo o amor, apoio e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Régis Gemerasca Mestriner, por todos os ensinamentos e pela atuação sempre muito próxima durante todas as etapas deste trabalho, indo além das suas responsabilidades para me dar suporte em tudo que precisei. Muito obrigado.

Ao mestre Prof. Dr. Léder Leal Xavier por me receber sempre de braços abertos, transmitindo grandes ensinamentos que levarei comigo por toda a vida.

Ao professor Dr. Denizar Alberto da Silva Melo que sempre me recebeu para conversar e dar conselhos quando precisei.

Ao Dr. Pedro Porto Alegre Baptista pelo auxílio em todos os momentos deste trabalho.

Aos professores e pesquisadores do Centro de Memória do Instituto do Cérebro da PUCRS, em especial ao mestre Prof. Dr. Iván Antônio Izquierdo, à Profa. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw e à Dra. Cristiane Regina Guerino Furini pela disponibilização de suas instalações, equipamentos e, sobretudo, por todos os fundamentais ensinamentos que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Biologia Celular e Tecidual, em especial aos que me auxiliaram nas diversas etapas deste trabalho.

A todos que passaram pela minha vida, que de uma forma ou outra contribuíram para construir a pessoa que sou hoje.

Aos funcionários do PPGBCM, sempre disponíveis e gentis.

À CAPES pela bolsa de custeio concedida.

“A fim de ver o mundo, temos de romper
com nossa aceitação habitual a ele.”

Maurice Merleau-Ponty

RESUMO

Sofrer experiências traumáticas constitui um fator de risco para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, com ou sem envolvimento aparente do sistema sensório-motor. No presente estudo nós testamos a hipótese de que memórias aversivas resistentes à extinção podem prejudicar o desempenho da marcha e alterar as densidades neuronal e glial, assim como a razão neurônio-glia na amígdala medial, em ratos Wistar adultos. Desta forma, nós estabelecemos um protocolo de trauma capaz de induzir uma memória resistente à extinção, testando na sequência seus efeitos sobre o desempenho sensório-motor da marcha e a histofisiologia da amígdala medial. Verificamos que a exposição ao protocolo de choque nas patas reduz o desempenho na marcha 3 dias após o referido evento aversivo ($P < 0.0001$). Além disso, a adoção de um “comportamento de segurança” no teste do labirinto em cruz elevado foi associada ao pior desempenho na marcha ($P < 0.001$). Uma tendência de significância estatística foi encontrada para as mudanças na densidade glial ($P = 0.10$) e na razão neurônio-glia ($P = 0.08$) da amígdala medial, assim como para a correlação destas variáveis com o desempenho sensório-motor ($P = 0.06$). Portanto, sofrer uma experiência traumática capaz de gerar memórias resistentes à extinção pode impactar em prejuízos à longo prazo no controle da marcha, afetando a habilidade de caminhar.

Palavras chave: Memória, Marcha, Medo, Amígdala, Desordens de Movimento.

ABSTRACT

Suffer traumatic experiences are a risk factor for developing neuropsychiatric movement disorders. In the present study, we test the hypothesis that aversive, resistant to extinction memories could impair skilled walking performance and change neuron and glia densities as well as neuron-glia ratio in medial amygdala in male Wistar rats. Thus, we established a major trauma protocol able to induce a resistant to extinction memory followed by testing its effects on skilled walking performance and medial amygdala histophysiology. Footshocks exposure reduces skilled walking performance 3 days after the hit ($P < 0.0001$). Additionally, the adoption of a “safety behavior” in the plus maze test was associated with worse ladder walking performance ($P < 0.001$). Statistical trend of significance were founded for changing glia ($P = 0.10$) and neuron-glia ratio ($P = 0.08$) in medial amygdala as well as for their correlation with sensorimotor performance ($P = 0.06$). Therefore, suffering traumatic experiences able to generate resistant to extinction memories could result in long-term impairment of gait control, which affects the walking ability.

Key words: Memory, Walking, Fear, Amygdala, Movement Disorder.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais conexões da amígdala basolateral..... 16

LISTA DE ABREVIATURAS

BA – Amígdala basal.

BLA – Amígdala basolateral.

CE – Amígdala central.

CEI – Amígdala central subdivisão látero-capsular.

CEm – Amígdala central medial.

CREB-1 - Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico 1.

CREB-2 - Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico 2.

CS – Estímulo condicionado.

FMD – Alterações funcionais do movimento, do inglês “*Functional movement disorders*”.

LA – Amígdala lateral.

IITC – Massas celulares intercaladas laterais.

MAP kinase – Proteína cinase ativada por mitógeno.

mITC – Massas celulares intercaladas mediais.

PKA – Proteína cinase A.

SD – Síndrome de Down

SNC – Sistema nervoso central.

US – Estímulo não condicionado.

vmPFC – Córtex pré-frontal ventromedial.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Memória: bases conceituais e estruturais	11
1.2 Medo, memória aversiva e desempenho sensório-motor.....	14
1.3 Relação neurônio-glia, aversividade, doenças psiquiátricas e função sensório-motora ..	20
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
4. MÉTODO, RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Comprovante de submissão do artigo científico.....	26
4.2 Artigo científico	28
6. CONCLUSÕES	33
7. PERSPECTIVAS	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXO: Carta de aprovação do projeto de pesquisa pela CEUA-PUCRS	39

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está organizada em tópicos: **Resumo**, **Abstract**, **Introdução**, **Justificativa**, **Objetivos**, **Método**, **Resultados e Discussão**, **Considerações Finais**, **Conclusão**, **Perspectivas** e **Referências**.

As sessões **Resumo** e **Abstract** apresentam uma síntese geral do presente estudo. A **Introdução** apresenta o embasamento teórico, que nos levou a formular a proposta de trabalho, seguida da **Justificativa** e dos **Objetivos**. A sessão **Método, Resultados e Discussão** contém o artigo científico (removido neste volume por razões de proteção autoral), organizado como resposta aos objetivos propostos. As **Considerações Finais** trazem uma argumentação integrativa que culmina na sessão **Conclusões**, esta última elaborada de modo objetivo e sumário. A sessão **Perspectivas** aborda uma lista de possibilidades para futuros trabalhos, a partir dos resultados descritos. Finalmente, a sessão **Referências** lista os trabalhos citados na Introdução e nas Considerações Finais. As referências utilizadas no artigo científico estão listadas ao final deste.

Os experimentos que deram origem a presente dissertação foram desenvolvidos no Centro de Memória do Instituto de Cérebro da PUCRS e as análises morfológicas foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual também nesta mesma Universidade.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Memória: bases conceituais e estruturais

Segundo o pensamento de Tom Regan, o qual se baseou na moral Kantiana, a capacidade de autoconsciência, de passado e de futuro, são alguns dos atributos fundamentais que nos tornam “sujeitos de uma vida” e, portanto, merecedores do direito de vivê-la (Zampieri e Susin, 2015). Partindo deste pressuposto é possível pensar que as memórias são fundamentais para a constituição de quem somos. A partir delas, nós somos capazes de construir um passado individual e coletivo, além de podermos significar experiências e idealizar o desejo de futuro, de uma vida a ser vivida.

Sob o ponto de vista neurobiológico, memória significa aquisição, formação, conservação e evocação de informações (Izquierdo, 2011). A formação de novas memórias e o consequente aprendizado são essenciais à sobrevivência, e seus mecanismos celulares e moleculares vêm sendo estudados por mais de um século. (McGaugh, 2000).

Sabe-se que, inicialmente, as memórias são formadas nos hipocampus e são lá mantidas por algumas semanas. Caso estas novas conexões sejam reforçadas, elas serão direcionadas para o córtex pré-frontal medial, onde se tornarão mais resistentes à extinção (Crystal and Glanzman, 2013). Alberini e LeDoux descreveram que a reativação de uma memória consolidada, por um estímulo que remeta o animal a experiência de aprendizado original (este é tipicamente o estímulo condicionado em um clássico paradigma de condicionamento), pode desencadear uma nova rodada de consolidação, o que convencionou-se chamar de reconsolidação. A reconsolidação de uma memória depende de muitos processos semelhantes, particularmente a síntese proteica, necessários para a consolidação da memória original (Alberini, 2005). Evidências indicam que quando as memórias são reconsolidadas com sucesso, elas tornam-se fortalecidas. Por outro lado, se a reconsolidação é impossibilitada, por exemplo, através da administração de um inibidor de síntese proteica, a memória pode ser enfraquecida ou eliminada completamente (Crystal and Glanzman, 2013). Além disso, sabe-se que a reconsolidação pode ocorrer em diversos animais, desde vermes nematoides até os seres humanos (Alberini and Ledoux, 2013).

Quanto ao conteúdo, a memória declarativa (explícita) e não declarativa (implícita) são as duas maiores classificações dos sistemas de memória. A memória declarativa nos permite conscientemente recordar fatos e eventos. Ela está geralmente ligada à nossa habilidade de recordar explicitamente ou reconhecer fatos e eventos. Já a memória não declarativa, ou de procedimento, é acessada sem a necessidade de envolvimento da consciência. A habilidade

motora em um esporte, em tricotar e o próprio medo são exemplos de memórias que se encaixam nesta classificação (Izquierdo, 2011; Squire e Dede, 2015).

A memória declarativa pode ser dividida em memória de longo prazo, curto prazo e de trabalho. A memória de longo prazo é aquela que você pode recordar ao longo de dias, meses ou anos após a sua aquisição, sendo que a memória de curto prazo dura de segundos a horas. Já a memória de trabalho, além de curta, exige um certo esforço para mantê-la, como por exemplo, ficar repetindo um número de telefone ou um endereço desconhecido por alguns instantes até que ocorra o uso desta informação. Entretanto, ao interrompermos a repetição, a sequência mental se perde (Squire e Dede, 2015).

Por outro lado, habilidades motoras, sensitivas, *priming*, hábito e reflexo condicionado são subdivisões da memória não declarativa. Habilidades motoras e sensitivas são os exemplos mais comuns de memória não declarativa, e compreendem, por exemplo, jogar futebol, tocar piano, caminhar, e muitos outros. *Priming* se refere à habilidade de identificar, produzir ou classificar algo como resultado de um encontro prévio com aquilo, ou algo relacionado (Schacter et al., 2004). Já no hábito não necessariamente a pessoa precisa lembrar-se de como fazer ou de quando aprendeu, ela simplesmente sabe fazer. E o reflexo condicionado, assim como o *priming*, é importante para preparar o indivíduo para uma resposta rápida frente a uma ameaça real ou potencial. Nele, ocorre a associação entre um estímulo condicionado (CS – do inglês – *conditioned stimulus*) e um estímulo não condicionado (US – do inglês – *unconditioned stimulus*) onde uma resposta fisiológica pode ser evocada apenas com um estímulo visual ou auditivo, outrora indiferente (Squire and Dede, 2015).

O córtex pré-frontal ventromedial (vmPFC - do inglês *ventromedial prefrontal cortex*), a amígdala, o estriado e o hipocampo são as principais estruturas encefálicas relacionadas com as memórias não declarativas (Figura 1). O aprendizado de habilidades motoras, o que envolve a velocidade, a precisão e a coordenação, é de grande importância para a sobrevivência. Ao treinarmos esse tipo de habilidade há uma rápida melhora no desempenho motor já na primeira sessão de treinamento, seguida por uma melhora lenta e gradual nas sessões seguintes.

Os circuitos córtico-estriatais atuam em conjunto neste aprendizado e a sua atividade muda quando a tarefa é rápida ou lenta (Costa et al., 2004; Yin et al., 2009). Também já foi observado que o estriado dorsomedial é mais ativado no início do treinamento, enquanto o estriado dorsolateral, em contraste, mostra uma maior ativação no treinamento tardio (Yin et al., 2009), sendo este, junto com o córtex infra-límbico, regiões de grande importância para a

formação de hábitos (Squire and Zola-Morgan, 2015). Além disso, a plasticidade do circuito córtico-estriatal também é necessária para o aprendizado de tarefas abstratas e de movimentos que envolvem o uso de neuropróteses (Koralek et al., 2012).

Em estudos de neuroimagem, a ocorrência do *priming* é frequentemente associado com uma atividade reduzida em regiões do neocórtex relevantes à tarefa (Schacter et al., 2004; Squire et al., 1992). Alguns estudos defendem a ideia de que uma redução na atividade cortical pode aumentar a velocidade do processamento perceptual (Grill-Spector et al., 2006; Schacter et al., 2004).

Já em nível molecular, os mecanismos de consolidação de memórias são razoavelmente bem conhecidos; estes incluem ativação de várias proteínas cinases ou proteínas fosfatases que, por sua vez, podem desencadear síntese proteica e transcrição ou repressão gênica. Os produtos moleculares desta síntese proteica e transcrição/repressão gênica medeiam a função de sinapses; o resultado final é a modificação persistente dos circuitos neurais no sistema nervoso dos animais, o que constitui a memória (Crystal and Glanzman, 2013).

Sabe-se que a formação e consolidação de memórias tanto declarativas quanto não declarativas, embora ocorram em regiões distintas e o meio de evocação também seja diferente, são compostas por dois estágios: um não dependente da síntese de proteínas e outro dependente.

As memórias de curto prazo dependem de modificações covalentes de proteínas preexistentes e o fortalecimento de sinapses, ao passo que as memórias de longo prazo dependem da síntese de novas proteínas e da criação de novas conexões. Além disso, ambas as formas de memória convertem as memórias de curto prazo para longo prazo através das mesmas vias de sinalização proteína cinase A (PKA – do inglês *protein kinase A*), Proteína cinase ativada por mitógeno (MAP kinase - do inglês *mitogen activated protein kinases*), Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico 1 (CREB-1 – do inglês *cyclic AMP response element-binding protein 1*), e Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico 2 (CREB-2 – do inglês *cyclic AMP response element-binding protein 2*). (Kandel, 2012)

Além disso, um estudo observou que neurônios com uma grande quantidade de *CREB switches*, necessários para a memória de longo prazo, são seletivamente recrutados na memória de medo. De fato, a atividade relativa da CREB no momento do aprendizado

determina se o neurônio será recrutado (Han et al., 2007). Reciprocamente, se tais neurônios são inibidos após o aprendizado, a memória de medo é bloqueada (Han et al., 2009).

1.2 Medo, memória aversiva e desempenho sensório-motor

Há mais de duas décadas, o neurocientista holandês Gert Holstege propôs que o sistema motor teria duas grandes subdivisões: o “sistema motor somático” e o “sistema motor emocional”. O primeiro, composto por áreas classicamente conhecidas por sua atividade motora e suas vias que as conectam aos motoneurônios; a segunda, relacionada à influência do sistema límbico em comportamentos emocionais específicos assim como sistema de ajustes de ganho, incluindo mecanismos desencadeadores de reflexos rítmicos e outros reflexos medulares (Holstege, 1992; Nieuwenhuys, 1996). Portanto, o sistema motor emocional pode influenciar, potencialmente, a aprendizagem e a execução de todos os movimentos de acordo com o fundo emocional e a capacidade de recuperação de suas memórias relacionadas (Waxman, 1996).

Dentre estas emoções, o medo é a emoção mais extensivamente estudada e vem sendo investigada através do condicionamento Pavloviano (LeDoux, 2014). Ivan Pavlov foi um fisiologista russo que descobriu que uma resposta fisiológica pode ser condicionada ao criar uma associação desta com um estímulo indiferente, emparelhando suas ocorrências algumas vezes. Porém em situações extremas como, por exemplo, um abuso sexual, desastres naturais e atentados contra a vida, as pessoas podem desenvolver um condicionamento em um único evento dada a intensidade do estímulo. Isso já foi reproduzido em roedores, onde um único estímulo altamente nocivo é capaz de gerar uma memória resistente à extinção (Diehl et al., 2012; Saur et al., 2015).

O fator central nestas situações supracitadas é o trauma, que de natureza física ou psicológica, pode ter desfechos impactantes na vida de uma pessoa. O sistema que é responsável por reconhecer estas situações ameaçadoras e preparar o organismo para o enfrentamento ou a fuga, através de um complexo mecanismo neural, é o sistema límbico (Herry and Johansen, 2014). São estruturas importantes deste sistema a amígdala, o hipocampo, o estriado, o córtex pré-frontal e a área motora suplementar (Aybek et al., 2015).

A amígdala é uma estrutura localizada na região medial do lobo temporal e pode ser funcionalmente dividida em dois grandes núcleos, com duas subdivisões cada: amígdala

basolateral (BLA) e amígdala central (CE), onde a BLA se divide em amígdala basal (BA) e amígdala lateral (LA) e a CE se divide em amígdala central medial (Cem) e amígdala central lateral (CEl). Além disso, existem núcleos de interneurônios inibitórios, chamados massas celulares intercaladas laterais (IITC – do inglês *lateral intercalated cell cluster*) e mediais (mITC – do inglês *medial intercalated cell cluster*) (Ehrlich et al., 2009; Haubensak et al., 2010). Estes núcleos diferem enormemente quanto à valência de seus estímulos, uma vez que a amígdala basolateral tem 80% de neurônios glutamatérgicos (excitatórios) enquanto que a amígdala central possui vasta maioria de neurônios GABAérgicos (inibitórios) (Ehrlich et al., 2009). Sabe-se que a amígdala tem um papel central na aquisição e expressão do medo condicionado Pavloviano, e os seus circuitos intrínsecos e extrínsecos já foram bem descritos (Duvarci and Pare, 2014; Ehrlich et al., 2009; Haubensak et al., 2010; Janak and Tye, 2015; Pare and Duvarci, 2012).

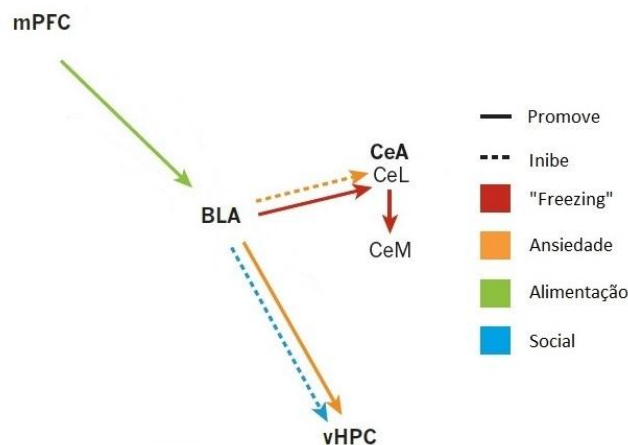


Figura 1. Amígdala e suas principais conexões. Esta é uma imagem seletiva das projeções que foram descritas neste trabalho, e não se destina a significar a sua importância sobre outras conexões anatômicas. A conectividade real da amígdala com outras regiões do cérebro é consideravelmente mais complexa. BLA: amígdala basolateral; CeA: núcleo central da amígdala; CeL: amígdala central lateral; CeM: amígdala central medial; mPFC: córtex pré-frontal medial; vHPC: hipocampo ventral. Adaptado de (Janak and Tye, 2015).

Por vezes, as atividades que estão sendo realizadas precisam ser abruptamente interrompidas na presença de um evento potencialmente nocivo. Se um animal está, por exemplo, deambulando ou caçando e é surpreendido por um predador ele será paralisado por uma complexa rede neurofisiológica a fim de escolher a melhor estratégia para tentar sair ileso desta ameaça (Sagaspe et al., 2011). É provável que através de suas conexões recíprocas o PFC e a BLA modifiquem sua atuação inibindo um ao outro através dos sinais externos de ameaça

ou segurança, de modo a engajar a melhor resposta comportamental (Tejeda and O'Donnell, 2014). A BLA também interage com o hipocampo, na modulação da consolidação de memórias e interfere na relação entre HP e PFC, porém os mecanismos responsáveis por essa supressão ainda não são completamente conhecidos (Tejeda and O'Donnell, 2014).

Entretanto, as conexões mais relevantes da amígdala, relacionadas ao comportamento sensorio-motor, são as realizadas com o córtex pré-frontal e a área motora suplementar (Tejeda and O'Donnell, 2014; Voon et al., 2010). Tejeda e O'Donnell demonstraram em 2014 que a ativação da BLA tem uma relação inversa com o PFC. Durante situações de processamento emocional, ansiedade e estresse ocorre uma maior ativação da BLA e, conseqüentemente, uma diminuição na atividade do PFC. Entretanto, quando estamos falando do controle cognitivo do processamento emocional ocorre o oposto, ou seja, uma maior ativação do PFC com uma diminuição na atividade da BLA (Tejeda and O'Donnell, 2014).

Uma condição clínica de diagnóstico complexo e que tem uma relação direta com todo este sistema de controle se chama *Functional Movement Disorder* (FMD). FMD é uma síndrome clínica definida pela ocorrência de movimentos anormais “involuntários” que são incompatíveis com uma causa neurológica conhecida. Os sintomas são significativamente melhorados durante o exame neurológico com o uso da distração e de manobras não fisiológicas (Miyasaki et al., 2015). Optamos por usar tal nomenclatura, embora tenhamos a consciência de que existe uma discussão sobre qual terminologia seria a mais adequada para caracterizar esta condição. Os autores que defendem o termo “funcional” alegam que o termo psicogênico não é bem recebido pelo paciente, que pode achar ofensivo, como se fosse algo forjado voluntariamente e/ou teatralizado. Já os autores que defendem o termo “psicogênico” dizem que o termo “funcional” é deveras vago, além de os pacientes sentirem-se “disfuncionais” ao invés de funcionais (Thenganatt and Jankovic, 2015). Considera-se, ainda, que é muito provável o envolvimento de fatores psicológicos e que eles devem ser abordados para um tratamento bem sucedido (Hallett, 2016).

Contudo, como a patogênese desta condição ainda não é bem compreendida, o debate provavelmente continuará acirrado (Hallett, 2016; Miyasaki et al., 2015). Cabe ressaltar que muitos termos já foram utilizados para descrever esta condição, tais como disfunção não orgânica, transtorno de conversão, psicossomática, sem explicação médica, dissociativa, histeria ou crise histérica (Thenganatt and Jankovic, 2015).

Um dos maiores avanços realizados na FMD nos últimos anos foi o refinamento dos critérios diagnósticos para esta condição, focando mais em sinais físicos positivos e na investigação destes achados do que no estresse psicológico (Edwards et al., 2013).

Outras condições que podem ser confundidas com FMD são simulação ou transtorno fictício, porém nestes o movimento é voluntário, (Thenganatt and Jankovic, 2015) enquanto que na FMD os movimentos são percebidos pelo sujeito de forma involuntária. No transtorno fictício os pacientes podem estar realizando os movimentos voluntariamente para satisfazer uma necessidade psicológica, sem uma recompensa externa óbvia. Já nos casos de simulação (*malingering*), os pacientes também estão realizando o movimento voluntariamente, porém para atingir um objetivo específico, como evitar trabalhar ou obter compensação financeira (Hallett, 2016; Thenganatt and Jankovic, 2015).

A incidência e prevalência precisas da FMD são desconhecidas, pois estudos de base populacional ainda não foram realizados. Estimativas da prevalência da FMD em adultos e crianças com distonias de movimento variam entre 2% e 4%, sendo as mulheres mais afetadas do que os homens. Uma revisão retrospectiva de um centro em Toronto (Morton and Gloria Shulman Movement Disorder Centre, Toronto Western Hospital, University of Toronto) observou que de 7624 registros 206 pacientes tiveram o diagnóstico de FMD, resultando em uma prevalência de 3% (dados não publicados) (Miyasaki et al., 2015). Já outras clínicas informam uma prevalência um pouco mais abrangente variando de 2% a 20% (Thenganatt and Jankovic, 2015). Ademais, é estimado que em torno de 10% dos pacientes com FMD tenham uma distonia orgânica associada (Hallett, 2016).

Apesar das incertezas, algumas pesquisas vêm paulatinamente elucidando as estruturas e os mecanismos que subjazem esta condição, como, por exemplo, Mehta et al. 2013. Esses autores realizaram um estudo no qual foram comparados, utilizando-se a tomografia por emissão de pósitrons com o marcador $H_2^{15}O$ ($H_2^{15}O$ PET), pacientes com distonia orgânica e psicogênica durante três tarefas distintas com o pé direito: posição relaxada, manter uma postura sustentada do pé ou realizar movimentos rítmicos contra um dinamômetro. Foi encontrada uma diferença significativa entre os grupos, onde o grupo com distonia orgânica demonstrou um padrão de ativação cortical, com aumento do fluxo sanguíneo no córtex motor primário, pré-motor e parietal aliado a uma diminuição do fluxo em estruturas subcorticais, incluindo o cerebelo. Em contraste, pacientes com distonia psicogênica demonstraram um aumento no fluxo em regiões subcorticais, incluindo o estriado

e o cerebelo, e concomitantemente uma redução na perfusão do córtex motor primário (Mehta et al., 2013).

Sabe-se que indivíduos saudáveis normalmente apresentam uma maior ativação da amígdala direita frente a estímulos negativos e positivos quando comparados a estímulos neutros; e negativos sobre positivos quando comparados entre si. No estudo de Voon, 2010 foi demonstrado, por meio da ressonância nuclear magnética, um aumento significativo na ativação da amígdala direita em pacientes com transtorno conversivo ao serem expostos a imagens de faces assustadas ou felizes quando comparado com pessoas normais. Além disso, estes pacientes apresentam o mesmo nível de ativação da amígdala direita para os estímulos bons e ruins, o que sugere uma hiperexcitação desta estrutura. Foi também observado um aumento na conectividade funcional entre a amígdala e a área motora suplementar em indivíduos com transtorno conversivo em relação aos indivíduos saudáveis (Voon et al., 2010).

Estas informações nos demonstram claramente a relação entre o sistema sensório-motor e o sistema límbico que, por sua vez, é o principal ator na resposta de luta ou fuga através da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Larzelere and Jones, 2008).

Um dos principais fatores que desencadeia esse tipo de resposta é o estresse. Sabe-se que nesta situação as células do hipotálamo que controlam a secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH – do inglês *corticotropin releasing hormone*) são estimuladas, liberando o referido hormônio. Após, o CRH liberado atua na adenohipófise estimulando a liberação do hormônio adenocorticotrópico (ACTH – do inglês *adenocorticotropic hormone*) na corrente sanguínea. Por sua vez, o ACTH leva a secreção de hormônios glicocorticoides (cortisol) pelo córtex da glândula adrenal. Estas relações neuro-hormonais constituem parte do chamado eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA – do inglês *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*). Além disso, os glicocorticoides exercem um efeito de retroalimentação negativa sobre o eixo HPA, ajudando a limitar a duração da resposta estressora (Larzelere and Jones, 2008).

Existem dois tipos de receptores em que o cortisol atua: o receptor glicocorticoide que é encontrado, dentre outros locais, no córtex motor, núcleos da base e cerebelo; e o receptor mineralocorticoide encontrado nas camadas corticais II, III, e V, sendo que a camada V dá origem ao trato corticoespinhal. Assim, ambos são encontrados em regiões encefálicas que participam do controle motor e podem influenciar no desempenho das atividades (Jadavji et al., 2011; Metz et al., 2001).

Embora a resposta ao estresse seja essencial e adaptativa às mudanças no meio em que vivemos, quando esta resposta é exagerada ou sustentada, pode resultar em alguns comprometimentos neurobiológicos, o que se observa após a exposição ao estresse prolongado (McIntosh and Sapolsky, 1996). Portanto, limitar a duração de tempo em que os tecidos corporais são expostos aos glicocorticoides oriundos do estresse é essencial para minimizar os efeitos catabólicos, anti-reprodutivos, imunossupressores e neurodegenerativos do cortisol/corticosterona, bem como reduzir a suscetibilidade de desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas (Musazzi et al., 2010; Tsigos and Chrousos, 2002).

As alterações sensório-motoras causadas pelo estresse já foram relativamente bem investigadas em roedores no trabalho de Metz e colaboradores (Metz et al., 2001). Esses autores evidenciaram que tanto o estresse agudo, subagudo quanto o crônico, são capazes de reduzir o desempenho sensório-motor de roedores no teste da escada horizontal e na tarefa de habilidade do alcance e preensão. Os animais estressados exibem alterações biomecânicas significativas na base de apoio dos membros posteriores durante a marcha e comprimento reduzidos das passadas. Por exemplo, estes autores já demonstraram em roedores a existência de alterações na atividade sensório-motora induzidas tanto por eventos estressores ambientais (Metz et al., 2005; Metz et al., 2001) quanto pela administração de glicocorticoides (Metz et al., 2005). Por exemplo, Metz et al. (2001) observaram déficits sensório-motores induzidos pelo estresse em diferentes testes comportamentais: 1) maior número de erros durante a marcha, no teste da escada horizontal; 2) diminuição no comprimento da passada, no teste da pegada impressa; e 3) pior desempenho no teste de remoção do adesivo, do inglês *adhesive removal test*.

Um trabalho posterior, do mesmo grupo de pesquisa, também evidenciou que eventos estressores variados podem induzir alterações sensório-motoras do membro anterior, especificamente no movimento de habilidade do alcance e preensão (*skilled reaching*) (Metz et al., 2005).

Desta forma, os dados da literatura permitem a proposição de uma hipótese: os eventos estressores, capazes de gerar memórias aversivas persistentes, talvez exerçam influência nos processos de controle sensório-motor em longo prazo, sugerindo que estes eventos possam impactar de forma crítica nos processos de aquisição e desempenho de gestos motores funcionais (Metz et al., 2001).

1.3 Relação neurônio-glia, aversividade, doenças psiquiátricas e função sensório-motora

Desde os primórdios da neurociência muitos cientistas acreditavam ferrenhamente que a transmissão de informações no encéfalo estaria baseada em um modelo sináptico de dois componentes (neurônios pré e pós-sinápticos). Tal ideia foi assumida como uma verdade intocável ao longo de décadas, dadas as interpretações do médico, cientista e político polonês Rudolf Ludwig Karl Virchow, que descrevia a glia (“cola”, em latim) como um grupo celular que, aparentemente, tinha apenas uma função de suporte nutricional e tecidual. Hoje se sabe que as células gliais, presentes em maior número do que os neurônios, são responsáveis pela formação, operação e adaptação dos circuitos neurais (Allen and Barres, 2009; Chung et al., 2015).

Os astrócitos, um dos tipos de células gliais, exercem inúmeras funções cruciais para o adequado funcionamento do sistema nervoso central (SNC). Especialmente ao longo das últimas décadas, diversos estudos vêm demonstrando que os astrócitos participam de uma ampla variedade de processos essenciais, tanto no SNC saudável quanto no lesado, incluindo o seu papel primário na modulação sináptica maturada, através de sinapses tripartites, (Halassa et al., 2007; Perea et al., 2009; Sofroniew and Vinters, 2010), no estabelecimento de novas sinapses, durante o período de desenvolvimento (Christopherson et al., 2005; Sofroniew and Vinters, 2010; Ullian et al., 2001), na regulação do fluxo sanguíneo cerebral local (Gordon et al., 2007; Iadecola and Nedergaard, 2007; Sofroniew and Vinters, 2010), no processamento de informações, dentre outras (Sofroniew and Vinters, 2010). Além disto, evidências também demonstram que a utilização do glicogênio astrocitário pode ser capaz de sustentar a atividade neuronal durante períodos de hipoglicemia e/ou durante períodos de alta atividade neuronal (Brown and Ransom, 2007; Sofroniew and Vinters, 2010). Adicionalmente, os astrócitos são capazes de responder, essencialmente, a todo tipo de lesão do SNC por meio de um processo denominado astrogliose reativa. Tal processo, bastante debatido e controverso quanto ao seus benefícios e malefícios funcionais, se tornou um marco patológico importante para a identificação de lesão tissular no SNC (Sofroniew and Vinters, 2010).

Uma das possibilidades de se mensurar alterações em regiões específicas no encéfalo está na relação entre o número de células gliais e células neuronais deste. A relação neurônio-glia já foi descrita como uma proporção de 1:10, porém, atualmente, muitos autores acreditam que ela se seja muito mais próxima de 1:1, já que não existe estudos conclusivos que comprovem tamanha diferença (Azevedo et al., 2009; Herculano-Houzel, 2014). Algumas

investigações vêm utilizando a relação neurônio-glia como um preditor da atividade neuronal local, uma vez que as células gliais, particularmente os astrócitos, tem um papel fundamental no fluxo de substratos para o neurônio pela regulação da captação de glicose e fosforilação em resposta à concentração de glutamato na fenda sináptica. (Tsacopoulos and Magistretti, 1996).

Ademais, já foram observadas alterações na relação neurônio-glia em doenças neuropsiquiátricas, como por exemplo, o transtorno depressivo maior familiar e o transtorno bipolar familiar. Em ambos os casos, a alteração da relação neurônio-glia se deu por uma diminuição na densidade glial sem alteração na densidade neuronal. Além disso, essa alteração na relação neurônio-glia foi observada apenas em algumas regiões, tais como o córtex subgenua, córtex orbital, córtex cingulado anterior e córtex pré-frontal dorsolateral, não ocorrendo, por exemplo, no córtex somato-sensorial dos sujeitos depressivos (Ongur et al., 1998; Rajkowska et al., 2001).

Também já foi avaliado o número total de neurônios e células gliais no córtex e nos núcleos da base de cérebros de portadores de síndrome de Down (SD). Neste, os indivíduos com SD apresentaram diminuição no número de neurônios no neocórtex (aproximadamente 40%) e semelhante diminuição de células gliais (aproximadamente 30%) na mesma região. Por outro lado o número de neurônios nos núcleos da base se manteve igual nos dois grupos, enquanto que o número de oligodendrócitos nesta região foi reduzido quase pela metade nos pacientes com SD. A relação neurônio-glia global não apresentou alterações entre os dois grupos, já a relação neurônio-glia nos núcleos da base provavelmente esteja bem diminuída, embora o estudo não tenha analisado os dados neste sentido (Karlsen and Pakkenberg, 2011). Também já foi observada uma diminuição na densidade glial e na relação neurônio-glia na amígdala de indivíduos depressivos (Bowley et al., 2002; Hamidi et al., 2004).

Por outro lado, um grupo de pesquisa brasileiro sugere que a constância na densidade astrocitária observada em diferentes espécies, incluindo os seres humanos, pode ter um significado fisiológico maior em relação à manutenção metabólica e suporte funcional do tecido cerebral do que a sua relação numérica com os neurônios (Azevedo et al., 2009).

Baseado nessas informações e no fato de não ter sido investigada até o presente momento, a alteração na relação neurônio-glia da amígdala medial e a sua influência no comportamento sensorio-motor, tornou-se objetivo deste estudo investigar tais alterações em ratos submetidos a um evento traumático resistente à extinção, já que, sabidamente, a amígdala apresenta-se como uma estrutura chave no processamento do medo e das memórias aversivas, bem como na sensibilização do sistema sensorio-motor emocional.

2. JUSTIFICATIVA

Desordens motoras coexistem em muitas doenças neuropsiquiátricas e já se sabe que alguns fatores aumentam o risco de desenvolvê-la, tais como, presenciar um evento traumático de cunho físico ou psicológico. Muitas vezes esta experiência leva à formação de uma memória traumática resistente à extinção, mesmo com o emprego da psicoterapia.

Uma classe de disfunções de movimento, de diagnóstico complexo e difícil, são as chamadas “desordens de movimento psicogênicas/funcionais”, do inglês “*functional movement disorders*”. Tais disfunções neuropsiquiátricas podem ser catalisadas através de situações traumáticas, como as descritas previamente, podendo acarretar no aparecimento de movimentos supostamente involuntários, tais como, ataxia, marcha, espasmos, tiques nervosos, tremor, dentre outros, todos com origem psicogênica/funcional.

Além disso, sabe-se que a amígdala é uma das estruturas mais importantes no processamento das memórias traumáticas, bem como na gênese das FMDs. Além disso, a fisiologia da atividade da amígdala é fortemente influenciada pela interação neuroquímica entre as células gliais e neuronais.

Neste sentido, desenvolver uma abordagem experimental capaz de identificar se uma memória traumática resistente à extinção pode de causar prejuízos sensório-motores e, ainda, verificar se os resultados teriam uma relação com a densidade neuronal, glial e a razão entre essas na amígdala, torna-se um desafio de grande valor para a compreensão dos neuropsiquiátricos que afetam o movimento funcional.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar, em ratos Wistar adultos, os efeitos de um evento traumático maior (protocolo de choque inescapável) sobre o desempenho em uma tarefa sensório-motora, bem como a sua relação com parâmetros histofisiológicos da amígdala medial.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar se o protocolo de trauma empregado é capaz de gerar uma memória traumática resistente à extinção;
- b) Avaliar a influência desta memória traumática resistente à extinção sobre o desempenho sensório-motor de roedores;
- c) Avaliar os efeitos do protocolo de trauma no comportamento símile de ansiedade, por meio do teste do labirinto em cruz elevado;
- d) Estimar a densidade neuronal, glial e a razão entre estas na amígdala medial, com o uso da técnica de Nissl.
- e) Correlacionar as variáveis comportamentais e histofisiológicas estudadas.

4. MÉTODO, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seguindo as recomendações do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS, a descrição dos métodos, os resultados alcançados e a discussão foram apresentados na forma de artigo científico. Contudo, o artigo foi removido do presente documento por razões de proteção autoral, já que pretendemos publicar este material em periódico científico internacional.

4.1 Comprovante de submissão do artigo científico

Thank you for your submission to Experimental Neurology

ees.yexnr.0.376b1f.bea33d5e@eesmail.elsevier.com em nome de
Experimental Neurology <expn@elsevier.com>

sex 19/02/2016 15:28

Para: regis.mestriner@gmail.com <regis.mestriner@gmail.com>; Regis Gemerasca Mestriner <regis.mestriner@puccs.br>;

Dear Dr. Mestriner,

Thank you for sending your manuscript A traumatic, extinction-resistant memory triggers skilled walking impairment in rats. for consideration to Experimental Neurology . Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

For Experimental Neurology , the average editorial time (in weeks) from submission to first decision is: 3.12 and from submission to final decision is: 5.44.

What happens next?

Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".

2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of Experimental Neurology , the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".

Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".

3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at <http://ees.elsevier.com/YEXNR>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: regis.mestriner@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/YEXNR/automail_query.asp

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu

3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in Experimental Neurology .

Kind regards,

Dr. Ahmet Hoke

If you require further assistance, you are welcome to contact our Researcher Support team 24/7 by live chat and email or 24/5 by phone: <http://support.elsevier.com>

4.2 Artigo científico

O artigo científico foi removido deste documento por razões de proteção de direitos autorais.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um número significativo de evidências científicas vem sendo acumulado sugerindo que sofrer uma experiência traumática pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos, tais como as FMDs (Drapier and Verin, 2012; Hallett, 2016; Shaibani and Sabbagh, 1998; Voon et al., 2010). Entretanto, diversos fatores como, por exemplo, a herança genética, o histórico familiar, as doenças crônicas, o uso de drogas ilegais, a falta de suporte social, dentre outros, frequentemente estão presentes na história dos pacientes (Drapier and Verin, 2012; Hallett, 2016). Desta forma, tais variáveis podem acarretar na confusão e/ou na superestimativa do efeito exercido pelas experiências traumáticas na patogênese de algumas doenças neuropsiquiátricas.

Por este ângulo, modelos animais podem ser de grande utilidade no intuito de reduzir os fatores intervenientes e permitir testar os efeitos dos paradigmas de trauma experimental no comportamento sensório-motor. Assim, o nosso principal objetivo foi avaliar a influência da persistência de uma memória aversiva no desempenho da marcha; bem como verificar se a experiência traumática é capaz de induzir alterações nas densidades neuronal e glial, assim como a relação neurônio-glia, na amígdala medial. Por fim, testamos se estas alterações poderiam estar correlacionadas com o desempenho da marcha. Contudo, como um primeiro passo, nós precisamos estabelecer um protocolo de experiência traumática realmente capaz de gerar uma memória de longo-prazo caracterizada como traumática e resistente à extinção, como foi demonstrado no experimento 1.

Nossos resultados demonstraram que o protocolo de memória aversiva resultou em um tipo de memória traumática resistente à extinção, o mesmo tipo de memória que geralmente está presente em muitas das FMDs. Outro aspecto relevante é que o protocolo mimetiza, em diversos aspectos, as situações de traumas que ocorrem em seres humanos, onde muitas vezes é o evento é único e sem possibilidade de fuga.

Outro objetivo de nosso estudo foi avaliar se os animais com uma memória traumática resistente à extinção sofreriam algum prejuízo no desempenho sensório-motor, avaliado por meio do teste da escada horizontal. Neste, foi observado um prejuízo na habilidade da marcha nos animais que sofreram o evento traumático, corroborando os resultados observados previamente no trabalho de Metz e colaboradores (Metz et al., 2001) em um protocolo de estresse diário agudo, subagudo e crônico. Apesar da literatura indicar que os níveis de corticosterona tendem a voltar aos níveis basais cerca de 24 horas após uma única experiência

de choque nas patas (em protocolo bastante semelhante ao utilizado), ainda não sabemos dizer se as alterações que nós encontramos se devem, ao menos em parte, ao estresse correlato ao trauma. Por outro lado, também é possível pensar que os resultados encontrados por Metz e colaboradores se devam à ocorrência de uma memória traumática desencadeada pelo protocolo de estresse empregado. Deste modo, acreditamos que esta temática poderá ser melhor investigada em trabalhos vindouros.

À parte da discussão supracitada, nós acreditamos que a demonstração em modelo animal de uma alteração sensório-motora induzida por uma experiência aversiva é animadora, podemos mensurar tais alterações com menos variáveis intervenientes do que em sujeitos diagnosticados com FMDs. É válido de nota que nós evitamos discutir o uso da terminologia “psicogênico” ou “funcional”, pois, em nosso entendimento, ela é irrelevante para o propósito do corrente trabalho (Dallocchio et al., 2015; Hallett, 2016).

Nosso estudo também avaliou outras variáveis não usuais no teste da escada horizontal, tais como: tempo total da tentativa (*trial time*), tempo para iniciar a tentativa (*time to start the trial*), número de pausas (*number of pauses*), tempo de imobilidade (*immobility time*) e número de desistências (*number of attempts of desistence*). A ausência de diferenças significativas entre os grupos trauma e sham quanto à estas variáveis sugere que os animais não apresentaram momentos significativos de generalização do medo ou “freezing”, o que nos leva a crer que o déficit sensório-motor resultante não deve ser devido a um quadro de medo desencadeado pelo contexto da escada horizontal, onde as barras de metal serviriam como lembrete situacional do evento traumático. Isto sugere que o protocolo de trauma aversivo utilizado pode ter resultado em uma alteração no processamento sensório-motor dos animais a partir de uma experiência traumática prévia, sob influência do sistema sensório-motor emocional. Ou seja, a desregulação do processamento límbico pode ter resultado em alterações no desempenho sensório-motor, corroborando os dados encontrados em seres humanos (Sagaspe et al., 2011).

Com o objetivo de avaliar se as alterações motoras se deviam realmente ao trauma e não à uma situação de ansiedade, nós realizamos o teste do labirinto em cruz elevado (EPM – do inglês *elevated plus maze*). Neste, os animais do grupo choque demonstraram uma diminuição na locomoção (através do número total de cruzamentos), tendendo a passar mais tempo nos braços abertos, o que a princípio é discordante do comportamento esperado para roedores (Korte e Boer, 2003) sob condições de medo ou ansiedade. Entretanto, uma publicação prévia demonstrou que sofrer doses altas de choque inescapável pode levar à

adoção uma estratégia chamada comportamento de segurança (*safety behavior*). Uma provável explicação para este resultado é que os animais generalizaram algumas impressões do aparato onde foi realizado o protocolo de memória aversiva e as tentativas de extinção. Ambos possuem três paredes fechadas, mais altas que a altura do animal em pé e com uma abertura anterior, onde no aparato do protocolo traumático havia uma porta de acrílico transparente. Assim, podemos imaginar que este foi o mesmo comportamento adotado pelos animais em nosso corrente estudo (Korem and Akirav, 2014).

No trabalho de Metz e colaboradores (Metz et al., 2001) os animais que obtiveram um pior desempenho na escada horizontal demonstraram maiores níveis de ansiedade quando comparados com o grupo controle, o que pode ter acontecido, segundo os autores, pela ansiedade que pode decorrer ao estresse.

A associação entre os escores obtidos na escada horizontal e algumas variáveis do labirinto em cruz elevado, tais como os cruzamentos (*total crossings*) e entradas nos braços fechados (*closed arm entries*) reforçam a ideia de que o número aumentado de erros na escada horizontal está associado à mudança comportamental induzida pelo trauma.

Por fim analisamos também a densidade neuronal e glial, assim como a relação neurônio-glia na amígdala medial. Não foram observadas alterações significativas na densidade neuronal, glial e, tampouco, na relação neurônio-glia. Talvez, o tempo entre o trauma e a eutanásia, que se deu 72 horas após a experiência aversiva, pode ser de fato curto para resultar em uma alteração significativa nestas estruturas no que diz respeito ao aumento e/ou diminuição da densidade celular. No entanto, a significância limítrofe observada nos indica que estas variáveis talvez possam ser influenciadas a partir da modulação da janela experimental.

Ainda, outras alterações neuronais e/ou gliais podem estar presentes, que não estão refletidas por meio do número absoluto destas células e/ou a relação entre ambas. Como já foram demonstradas em outros estudos, as alterações podem estar relacionadas ao tamanho celular, ao número de ramificações e polarização astrocitária, a concentração de determinadas moléculas dentro das células, dentre outras.

Até o presente momento, os estudos que avaliaram a relação neurônio-glia em doenças neuropsiquiátricas tais como o transtorno bipolar (Rajkowska et al., 2001), transtorno depressivo maior (Bowley et al., 2002; Hamidi et al., 2004) e a síndrome de down (Karlsen and Pakkenberg, 2011) foram capazes de demonstrar algumas alterações importantes. Contudo, que seja de nosso conhecimento, não existem estudos desta natureza em modelos experimentais animais correlatos. Contudo, não se pode descartar que a amígdala tenha uma

maior relevância nestes transtornos em seres humanos do que em roedores. Além disso, existe uma grande dificuldade em reproduzir a complexidade das doenças neuropsiquiátricas em animais, pois estas normalmente envolvem fatores relacionados a sentimentos e à auto percepção, difíceis de serem avaliadas em animais não-humanos.

Finalmente, por ser uma primeira evidência em roedores, mais estudos avaliando os efeitos de uma memória traumática resistente à extinção no controle sensório-motor, assim como a sua relação com a interação neurônio-glia, são necessários para esclarecer a participação das memórias aversivas no desempenho sensório-motor, contribuindo, assim, para uma melhor compreensão da fisiopatologia das FMDs.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta dissertação permitem concluir que:

- O protocolo de trauma por meio de choque inescapável foi capaz de desenvolver uma memória traumática resistente à extinção em ratos wistar adultos;
- Uma experiência traumática capaz de gerar uma memória aversiva resistente à extinção prejudicou o desempenho sensório-motor dos roedores, o que pôde ser observado por meio do teste da escada horizontal e das correlações com o comportamento no labirinto em cruz elevado;
- O protocolo de trauma não foi capaz de alterar a relação neurônio-glia na amígdala medial, embora a tendência estatística obtida sugira que ela não deva ser completamente descartada.

7. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados alcançados, uma série de perspectivas são possíveis. Abaixo, resumimos algumas das principais ideias que tivemos para o seguimento desta linha de pesquisa:

- Verificar por quanto tempo perduram os déficits na habilidade da marcha utilizando este mesmo modelo de trauma;
- Avaliar se este modelo de trauma pode acarretar em prejuízo no aprendizado sensório-motor de outras tarefas corretas, tais como a habilidade do alcance e preensão;
- Pesquisar os efeitos de intervenções farmacológicas em diferentes momentos do treino e do protocolo de extinção, o que inclui a modulação da memória aversiva;
- Pesquisar os parâmetros histofisiológicos de células neuronais e gliais na amígdala, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, em diferentes momentos pós-trauma.
- Avaliar os níveis de corticosterona ao longo do tempo, com o intuito de compreender melhor a relação entre estresse, memória aversiva e os resultados obtidos no teste da escada horizontal.
- Avaliar se o número reduzido de cruzamentos e entradas nos braços fechados no labirinto em cruz elevado realmente se deve ao comportamento de defesa (*safety behavior*) ou a um possível prejuízo sensório-motor-induzido pela experiência traumática.

REFERÊNCIAS

- Zampieri, G., Susin, L.C. A vida dos outros: Ética e teologia da libertação animal. Porto Alegre: Editora Paulinas, 2015.
- Izquierdo, I. Memória. 2. ed. Porto alegre: Artmed, 2011.
- McGaugh, J.L., 2000. Memory - a century of consolidation. *Science* 287, 248-51.
- Crystal, J.D., Glanzman, D.L., 2013. A biological perspective on memory. *Curr Biol* 23, R728-31.
- Alberini, C.M., 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28, 51-6.
- Alberini, C.M., Ledoux, J.E., 2013. Memory reconsolidation. *Curr Biol* 23, R746-50.
- Squire, L.R., Dedee, A.J., 2015. Conscious and unconscious memory systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a021667.
- Schacter, D.L., Dobbins, I.G., Schnyer, D.M., 2004. Specificity of priming: a cognitive neuroscience perspective. *Nat Rev Neurosci* 5, 853-62.
- Costa, R.M., Cohen, D., Nicolelis, M.A., 2004. Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice. *Curr Biol* 14, 1124-34.
- Yin, H.H., Mulcare, S.P., Hilario, M.R., Clouse, E., Holloway, T., Davis, M.I., Hansson, A.C., Lovinger, D.M., Costa, R.M., 2009. Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat Neurosci* 12, 333-41.
- Koralek, A.C., Jin, X., Long, J.D., 2nd, Costa, R.M., Carmena, J.M., 2012. Corticostriatal plasticity is necessary for learning intentional neuroprosthetic skills. *Nature* 483, 331-5.
- Squire, L.R., Ojemann, J.G., Miezin, F.M., Petersen, S.E., Videen, T.O., Raichle, M.E., 1992. Activation of the hippocampus in normal humans: a functional anatomical study of memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1837-41.
- Grill-Spector, K., Henson, R., Martin, A., 2006. Repetition and the brain: neural models of stimulus-specific effects. *Trends Cogn Sci* 10, 14-23.
- Kandel, E.R., 2012. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain* 5, 14.
- Han, J.H., Kushner, S.A., Yiu, A.P., Cole, C.J., Matynia, A., Brown, R.A., Neve, R.L., Guzowski, J.F., Silva, A.J., Josselyn, S.A., 2007. Neuronal competition and selection during memory formation. *Science* 316, 457-60.
- Han, J.H., Kushner, S.A., Yiu, A.P., Hsiang, H.L., Buch, T., Waisman, A., Bontempo, B., Neve, R.L., Frankland, P.W., Josselyn, S.A., 2009. Selective erasure of a fear memory. *Science* 323, 1492-6.
- Holstege, G., 1992. The emotional motor system. *Eur J Morphol* 30, 67-79.

- Nieuwenhuys, R., 1996. The greater limbic system, the emotional motor system and the brain. *Prog Brain Res* 107, 551-80.
- Waxman, S.G., 1996. Clinical observations on the emotional motor system. *Prog Brain Res* 107, 595-604.
- LeDoux, J.E., 2014. Coming to terms with fear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 2871-8.
- Diehl, L.A., Alvares, L.O., Noschang, C., Engelke, D., Andrezza, A.C., Goncalves, C.A., Quillfeldt, J.A., Dalmaz, C., 2012. Long-lasting effects of maternal separation on an animal model of post-traumatic stress disorder: effects on memory and hippocampal oxidative stress. *Neurochem Res* 37, 700-7.
- Saur, L., Baptista, P.P., Bagatini, P.B., Neves, L.T., de Oliveira, R.M., Vaz, S.P., Ferreira, K., Machado, S.A., Mestriner, R.G., Xavier, L.L., 2015. Experimental Post-traumatic Stress Disorder Decreases Astrocyte Density and Changes Astrocytic Polarity in the CA1 Hippocampus of Male Rats. *Neurochem Res*.
- Herry, C., Johansen, J.P., 2014. Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nat Neurosci* 17, 1644-54.
- Aybek, S., Nicholson, T.R., O'Daly, O., Zelaya, F., Kanaan, R.A., David, A.S., 2015. Emotion-motion interactions in conversion disorder: an fMRI study. *PLoS One* 10, e0123273.
- Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Ciocchi, S., Herry, C., Luthi, A., 2009. Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron* 62, 757-71.
- Haubensak, W., Kunwar, P.S., Cai, H., Ciocchi, S., Wall, N.R., Ponnusamy, R., Biag, J., Dong, H.W., Deisseroth, K., Callaway, E.M., Fanselow, M.S., Luthi, A., Anderson, D.J., 2010. Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. *Nature* 468, 270-6.
- Duvarci, S., Pare, D., 2014. Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron* 82, 966-80.
- Janak, P.H., Tye, K.M., 2015. From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* 517, 284-92.
- Pare, D., Duvarci, S., 2012. Amygdala microcircuits mediating fear expression and extinction. *Curr Opin Neurobiol* 22, 717-23.
- Sagaspe, P., Schwartz, S., Vuilleumier, P., 2011. Fear and stop: a role for the amygdala in motor inhibition by emotional signals. *Neuroimage* 55, 1825-35.
- Tejeda, H.A., O'Donnell, P., 2014. Amygdala inputs to the prefrontal cortex elicit heterosynaptic suppression of hippocampal inputs. *J Neurosci* 34, 14365-74.
- Voon, V., Brezing, C., Gallea, C., Ameli, R., Roelofs, K., LaFrance, W.C., Jr., Hallett, M., 2010. Emotional stimuli and motor conversion disorder. *Brain* 133, 1526-36.
- Miyasaki, J.M., Hurtig, H.I., Dashe, J.F., 2015. Functional Movement Disorders. *UpToDate*.
- Thenganatt, M.A., Jankovic, J., 2015. Psychogenic movement disorders. *Neurol Clin* 33, 205-24.

- Hallett, M., 2016. Functional (psychogenic) movement disorders - Clinical presentations. *Parkinsonism Relat Disord* 22 Suppl 1, S149-52.
- Edwards, M.J., Fotopoulou, A., Parees, I., 2013. Neurobiology of functional (psychogenic) movement disorders. *Curr Opin Neurol* 26, 442-7.
- Mehta, A.R., Rowe, J.B., Schrag, A.E., 2013. Imaging psychogenic movement disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13, 402.
- Larzelere, M.M., Jones, G.N., 2008. Stress and health. *Prim Care* 35, 839-56.
- Jadavji, N.M., Supina, R.D., Metz, G.A., 2011. Blockade of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors reverses stress-induced motor impairments. *Neuroendocrinology* 94, 278-90.
- Metz, G.A., Schwab, M.E., Welzl, H., 2001. The effects of acute and chronic stress on motor and sensory performance in male Lewis rats. *Physiol Behav* 72, 29-35.
- McIntosh, L.J., Sapolsky, R.M., 1996. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. *Exp Neurol* 141, 201-6.
- Musazzi, L., Milanese, M., Farisello, P., Zappettini, S., Tardito, D., Barbiero, V.S., Bonifacino, T., Mallei, A., Baldelli, P., Racagni, G., Raiteri, M., Benfenati, F., Bonanno, G., Popoli, M., 2010. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS One* 5, e8566.
- Tsigos, C., Chrousos, G.P., 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53, 865-71.
- Metz, G.A., Jadavji, N.M., Smith, L.K., 2005. Modulation of motor function by stress: a novel concept of the effects of stress and corticosterone on behavior. *Eur J Neurosci* 22, 1190-200.
- Allen, N.J., Barres, B.A., 2009. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457, 675-7.
- Chung, W.S., Allen, N.J., Eroglu, C., 2015. Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020370.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Haydon, P.G., 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 13, 54-63.
- Perea, G., Navarrete, M., Araque, A., 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32, 421-31.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7-35.
- Christopherson, K.S., Ullian, E.M., Stokes, C.C., Mallowney, C.E., Hell, J.W., Agah, A., Lawler, J., Moshier, D.F., Bornstein, P., Barres, B.A., 2005. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120, 421-33.

Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S., Barres, B.A., 2001. Control of synapse number by glia. *Science* 291, 657-61.

Gordon, G.R., Mulligan, S.J., MacVicar, B.A., 2007. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia* 55, 1214-21.

Iadecola, C., Nedergaard, M., 2007. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 10, 1369-76.

Brown, A.M., Ransom, B.R., 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55, 1263-71.

Azevedo, F.A., Carvalho, L.R., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E., Leite, R.E., Jacob Filho, W., Lent, R., Herculano-Houzel, S., 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513, 532-41.

Herculano-Houzel, S., 2014. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62, 1377-91.

Tsacopoulos, M., Magistretti, P.J., 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16, 877-85.

Ongur, D., Drevets, W.C., Price, J.L., 1998. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13290-5.

Rajkowska, G., Halaris, A., Selemon, L.D., 2001. Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 49, 741-52.

Karlsen, A.S., Pakkenberg, B., 2011. Total numbers of neurons and glial cells in cortex and basal ganglia of aged brains with Down syndrome--a stereological study. *Cereb Cortex* 21, 2519-24.

Bowley, M.P., Drevets, W.C., Ongur, D., Price, J.L., 2002. Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 52, 404-12.

Hamidi, M., Drevets, W.C., Price, J.L., 2004. Glial reduction in amygdala in major depressive disorder is due to oligodendrocytes. *Biol Psychiatry* 55, 563-9.

Drapier, S., Verin, M., 2012. [Psychogenic movement disorders]. *Rev Neurol (Paris)* 168, 662-7.

Shaibani, A., Sabbagh, M.N., 1998. Pseudoneurologic syndromes: recognition and diagnosis. *Am Fam Physician* 57, 2485-94.

Dalocchio, C., Marangi, A., Tinazzi, M., 2015. Functional or psychogenic movement disorders: an endless enigmatic tale. *Front Neurol* 6, 37.

Korem, N., Akirav, I., 2014. Cannabinoids prevent the effects of a footshock followed by situational reminders on emotional processing. *Neuropsychopharmacology* 39, 2709-22.

Korte SM, De Boer SF. 2003. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *European journal of pharmacology* 463, 163-75.

ANEXO: Carta de aprovação do projeto de pesquisa pela CEUA-PUCRS

Carta de aprovação do projeto de pesquisa pela CEUA-PUCRS. Esta dissertação está contemplada em um projeto de pesquisa maior, constituindo-se como a sua primeira fase.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 19/2015 - CEUA

Porto Alegre, 24 de abril de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00442, intitulado **“Desempenho sensorio-motor e morfologia astrogliar em um modelo de estresse pós-traumático: Efeitos do tratamento com cetamina e da extinção do medo condicionado ao contexto”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data. Contudo, sugerimos que o pesquisador responsável atente para dois itens do formulário unificado em submissões futuras:

- No item que contempla a certificação dos membros da equipe em relação ao manuseio dos animais, não devem ser informadas disciplinas que não tenham este papel, tampouco treinam o usuário em relação à experimentação animal.
- Em relação à quarentena e aclimação, recomendamos que os pesquisadores incluam um período de aclimação após o transporte dos animais. Dada a natureza das variáveis e métodos a serem empregados, o transporte dos animais pode impactar negativamente às variáveis neurocomportamentais.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512

CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS

Fone: (51) 3353-6365

E-mail: ceua@pucrs.br