

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA

Fernanda Nogueira Lotz Alves

CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA EM RATOS ADOLESCENTES:
AVALIAÇÃO DA PRECISÃO DA MEMÓRIA E DA DEPENDÊNCIA
HIPOCAMPAL EM AMBOS OS SEXOS

Porto Alegre, 2016

Fernanda Nogueira Lotz Alves

CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA EM RATOS ADOLESCENTES:
AVALIAÇÃO DA PRECISÃO DA MEMÓRIA E DA DEPENDÊNCIA
HIPOCAMPAL EM AMBOS OS SEXOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt

Co-orientadora: M^a Ana Paula Crestani

Porto Alegre, 2016

A memória é o tesouro e guardião de todas as coisas.
Cícero

AGRADECIMENTOS

Ao professor Jorge Quillfeldt, meu orientador, por ter me aceitado em seu laboratório e aberto o mundo fascinante da neurociência para mim.

À Ana Paula Crestani, minha co-orientadora, que, com infinita paciência e boa vontade, me ajudou com esse trabalho de conclusão do começo ao fim.

Ao professor Lucas de Oliveira Alvares por sua disposição e comentários sempre úteis.

Aos meus colegas do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (LBNC): Flávia e Krislei, por sua ajuda com procedimentos cirúrgicos e histológicos e Rodrigo por seus comentários úteis referentes ao projeto submetido ao comitê de ética.

Aos meus colegas do Laboratório de Neurobiologia da Memória (LNM): Lizeth e Mirelle por comentários relevantes, sugestões e ajuda com cirurgia e infusões; Bruno por seus comentários e sugestões sobre esta monografia; Walquíria por sua ajuda na fabricação de cânulas e na anestesia dos animais.

À Paula, Josué, Jadier, Kamilla, Pablo, Laura, Bruna, Ana Paula M., Vanessa, Gustavo e Stephanie, obrigada pela amizade e convivência que fazem desse lugar um ambiente tão estimulante.

À D. Zelma pelo cuidado aos animais e disposição a ajudar sempre que precisei.

Por último mas não menos importante, à minha família pelo incentivo e encorajamento nos momentos difíceis. Sem seu apoio não teria chegado onde cheguei.

Todos vocês tornaram este projeto possível e a vida uma viagem de descobertas.

RESUMO

Memórias contextuais tendem a ficar mais genéricas com o passar do tempo, tornando-se independentes do hipocampo e dependentes do córtex para a sua evocação, um processo denominado ‘consolidação sistêmica’. Esse efeito é aumentado com intervalos de tempo mais longos entre o treino e teste. A generalização, que nada mais é que a perda de precisão, é uma característica adaptativa importante da memória. Em mamíferos, o cérebro sofre uma variedade de mudanças na adolescência em estruturas que são importantes na modulação de processos da memória. Além disso, hormônios sexuais atuam sobre o cérebro e influenciam nas funções cognitivas, inclusive na memória, de forma específica ao sexo. Para verificar a precisão da memória, treinamos ratos *Wistar* adolescentes (P42-P49) machos e fêmeas no Condicionamento Aversivo ao Contexto, uma tarefa dependente do hipocampo, e os testamos 2,7,14 e 21 dias após no contexto em que foram treinados ou num novo. Para avaliar a dependência do hipocampo ratos fêmeas (P42-43) foram infundidas intrahipocampalmente com muscimol ou salina e testadas no contexto onde haviam recebido o choque.

Resultados anteriores do nosso laboratório mostraram que ratos adolescentes machos generalizam a memória de medo aos 14 dias após o treino. Nossos resultados mostram que as fêmeas generalizam aos 21 dias, e machos têm a memória precisa aos 21 dias. Como esperado, a memória mantém-se precisa em ambos machos e fêmeas quando testadas 2 ou 7 dias após.

Palavras-chave: memória, consolidação sistêmica, precisão, hipocampo, adolescência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	página 9
1.1. Definição de memória.....	página 9
1.2. Fases da memória.....	página 9
1.3. Classificação das memórias.....	página 10
1.3.1. Quanto ao tempo de duração.....	página 10
1.3.2. Com base no conteúdo.....	página 11
1.4. Consolidação de memórias.....	página 12
1.4.1. Consolidação sináptica.....	página 13
1.4.2. Consolidação sistêmica.....	página 13
1.5. Precisão e Generalização.....	página 16
1.6. Adolescência: um período de mudanças.....	página 17
1.6.1. Dimorfismo neuromorfológico na adolescência.....	página 18
1.7. Hormônios sexuais e sua relação com a generalização da memória.....	página 18
2. JUSTIFICATIVA.....	página 19
3. OBJETIVO GERAL.....	página 20
3.1. Objetivos gerais.....	página 20
4. METODOLOGIA.....	página 21
4.1. Animais.....	página 21
4.2. Escolha da idade.....	página 21
4.3. Procedimentos cirúrgicos.....	página 22
4.4. Fármacos.....	página 22
4.5. Infusões.....	página 23
4.6. Descrição dos experimentos.....	página 23
4.6.1. Curva de generalização.....	página 23
4.6.2. Dependência hipocampal.....	página 24
4.7. Procedimentos comportamentais.....	página 24
4.8. Descrição dos contextos.....	página 25
4.9. Estatística.....	página 25
5. RESULTADOS.....	página 26
5.1. Avaliação da curva de generalização da memória.....	página 26
5.2. Avaliação da dependência hipocampal.....	página 31
6. DISCUSSÃO.....	página 32
7. CONCLUSÕES.....	página 36
8. PERSPECTIVAS.....	página 36
9. REFERÊNCIAS.....	página 37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases do processamento da memória.....	página 10
Figura 2. Classificação de memórias de longa duração.....	página 11
Figura 3. Tipos de consolidação.....	página 13
Figura 4. Esquema ilustrando o modelo padrão da consolidação da memória, que postula que as memórias ficam independentes do hipocampo e ficam representadas no córtex com o passar do tempo.....	página 15
Figura 5. Esquema ilustrando a teoria dos múltiplos traços, em que as memórias episódicas antigas ainda necessitam do hipocampo para sua evocação.....	página 16
Figura 6. Diferentes estágios do desenvolvimento do rato.....	página 21
Figura 7. Esquema ilustrando o protocolo dos experimentos.....	página 23
Figura 8. Esquema ilustrando o protocolo do experimento da dependência hipocampal. O freezing foi quantificado no teste e reteste.....	página 24
Figura 9. Protocolo padrão (treino).....	página 24
Figura 10. Desenho experimental para os experimentos da curva de generalização.....	página 26
Figura 11. Dois dias após o treino os machos distinguem os contextos original e novo, a memória é precisa.....	página 27
Figura 12. Sete dias após o treino os machos distinguem os contextos original e novo, a memória é precisa.....	página 27
Figura 13. Quatorze dias após o treino a memória é generalizada.....	página 28
Figura 14. Vinte e um dias após o condicionamento os machos distinguem os contextos original e novo, a memória é precisa.....	página 28
Figura 15. Dois dias após o condicionamento as fêmeas distinguem os contextos original e novo, a memória é precisa.....	página 29
Figura 16. Sete dias após o condicionamento as fêmeas distinguem os contextos original e novo, a memória é precisa.....	página 29
Figura 17. Quatorze dias após o condicionamento as fêmeas distinguem os contextos original e novo, a memória é precisa.....	página 30
Figura 18. Vinte e um dias após o condicionamento a memória é generalizada.....	página 30
Figura 19. Gráfico de dispersão comparativo entre os intervalos de tempo.....	página 31

Figura 20. Desenho experimental para os experimentos da dependência hipocampal.....	página 31
Figura 21. Teste: a inativação farmacológica do hipocampo com muscimol resultou em baixos níveis de freezing. Reteste: sem ação do muscimol, a memória aversiva é expressa em nível igual ao controle.....	página 31
Figura 22. Gráfico de dispersão.....	página 32
Figura 23. Desenvolvimento do córtex prefrontal.....	página 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos até agora.....	página 32
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BNDF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês brain-derived neurotrophic factor)

CA1 – Corno de Amon subregião 1

CA3 – Corno de Amon subregião 3

CAC – Condicionamento Aversivo Contextual

ER – receptor de estrogênio

GABA – Ácido γ -aminobutírico (do inglês γ aminobutyric acid)

P acompanhado de numeração (Ex. P42) – data Pós-natal

~P acompanhado de numeração (Ex. ~P42) – data Pós-natal aproximada

PBS – Tampão fosfato-salino (do inglês phosphate-buffered saline)

PFC – Córtex Pré-frontal

TEPT – Transtorno de Estresse Pós-Traumático

1. INTRODUÇÃO

A memória é, sem dúvida, um dos aspectos mais fascinantes da cognição. Sem ela não teríamos um sentido do passado, vivendo no presente por breves momentos sem ter um fio que conectasse esses momentos, e seríamos fadados a repetir os mesmos erros no futuro. Teríamos um sentido limitado de nós, nossas realidades internas não possuiriam a riqueza de experiências passadas para colorir a nossa percepção atual. As memórias nos dão a nossa individualidade e singularidade no mundo. O estudo da memória é um terreno fértil para as atividades filosóficas e científicas, e tem estado na mente da humanidade, que pensou e escreveu sobre ela desde a história antiga. Os gregos antigos, especialmente aqueles versados na arte da retórica e oratória, adoravam a Mnemosine, a deusa da memória. O romano antigo Cícero escreveu sobre a “arte da memória”, que consiste em técnicas mnemônicas ainda em uso hoje (YATES, 2011 p. 18). Aristóteles escreveu extensivamente sobre a memória, ideias que mais tarde foram elaboradas por estudiosos medievais e filósofos (YATES, 2011 p. 45- 46). A memória e suas implicações tem sido um assunto de curiosidade através dos tempos, mas o quê, afinal, é a memória?

1.1 Definição da memória

Iván Izqueirido, em seu livro “Memória” (2011), define a memória como a “aquisição, formação, conservação e evocação de informações”. Essas informações são adquiridas através dos sentidos e armazenadas no cérebro, podendo ser evocadas posteriormente.

1.2 Fases da memória

O processamento de memórias pode ser dividido em diferentes fases para facilitar a compreensão desse complexo fenômeno (fig.1).

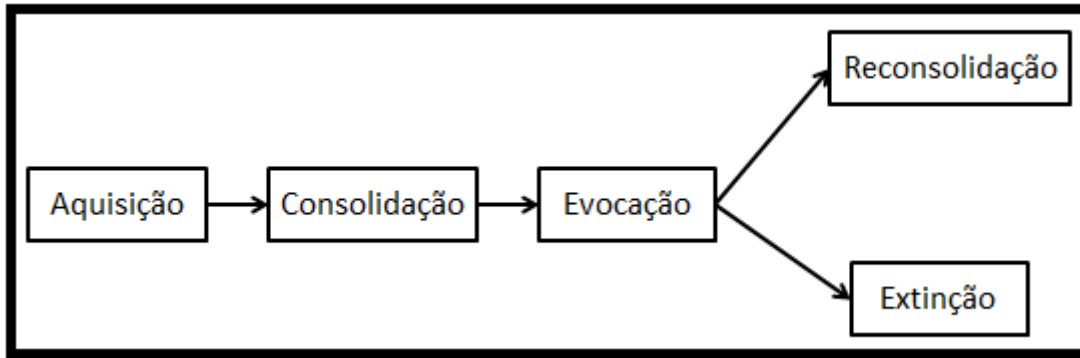


Figura 1. Fases do processamento da memória.

Aquisição refere-se a aprendizagem de novas informações adquiridas através de experiências. Estas informações são *consolidadas*, um período onde a memória lábil/instável é estabilizada de maneira que se torne suscetível a modificações ou interferências. Memórias que foram consolidadas podem ser lembradas, o que tecnicamente chamamos de *evocação*. Ao serem evocadas, o traço da memória pode ser tornar novamente lábil, sendo novamente necessário um processo de estabilização, a *reconsolidação*; ou ainda, podem ser *extintas*, devido a sobreposição de uma nova memória que causa enfraquecimento daquela que foi previamente adquirida.

1.3 Classificação das Memórias

As memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo de duração ou com base no conteúdo.

1.3.1. Quanto ao tempo de duração

Quantos tipos de memória são necessários para ler um livro? Você provavelmente não se lembra das primeiras duas palavras da introdução dessa monografia, nem consegue recordar todas as palavras em ordem, mas extraiu a informação geral contida no texto. Quanto tempo essa informação ficará na memória depende de alguns fatores como a emoção e atenção.

As memórias podem durar de alguns segundos, suficiente para lembrar as

primeiras palavras de uma frase até completá-la, a horas ou dias ou até uma vida inteira.

Memórias que persistem no cérebro por segundos ou minutos antes de serem consolidadas em memória de curta duração são denominadas *memória de trabalho*. Modulada pelo PFC dorsolateral (DIAMOND, 2013), esse tipo de memória não deixa um traço bioquímico ou estrutural duradouro (IZQUIERDO, 2011). Em humanos, adultos jovens tendem a ter melhores memórias de trabalho do que crianças, provavelmente devido a melhor velocidade de processamento (BAYLISS *et al.*, 2003) e capacidade de manipular informações mentalmente (CRONE *et al.*, 2006). A *memória de curta duração* tipicamente dura de uma até seis horas antes de ser consolidada em memória de longa duração. Não requer síntese proteica nem expressão gênica e são suscetíveis a perturbações farmacológicas ou físicas. A *memória de longa duração* leva de duas a seis horas para ser formada e depende da síntese proteica para ser consolidada (IZQUIERDO, 2004 p. 21). Após formadas, podem durar horas, dias ou até anos. Em humanos, *memória remota* se refere à memória que dura muitas décadas (IZQUIERDO, 2004 p. 19).

1.3.2. Com base no conteúdo

As memórias de longa duração se dividem em memórias declarativas, ou explícitas, e não declarativas, ou implícitas.

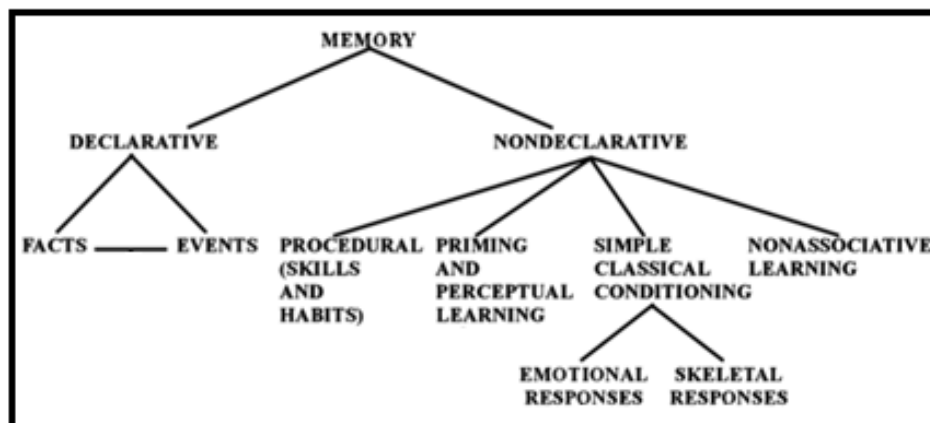


Figura 2. Classificação de memórias de longa duração (retirado e adaptado de Squire 2004).

A memória *declarativa* se refere à capacidade de conscientemente evocar memórias semânticas (fatos) e episódicas ou autobiográficas (eventos) e depende de

estruturas no lobo temporal medial e diencéfalo. Memórias *não-declarativas*, por sua vez, são aquelas que não são conscientemente evocadas e são independentes do lobo temporal medial (SQUIRE, 2004). Estes podem ser divididos em memórias procedurais, que consiste em hábitos e habilidades adquiridas; “priming” e aprendizagem perceptual, aprendizagem não-associativa e ainda condicionamento clássico simples, que podem se manifestar como respostas emocionais ou esqueléticas.

1.4. Consolidação de memórias

Como observou DUDAI (2004) em sua revisão, possivelmente a referência mais antiga registrada para a consolidação da memória foi a do orador romano Quintiliano, que, no século I EC escreveu “o intervalo de uma única noite aumentará muito a força de uma memória”, e continua com “...o poder da lembrança...sofre um processo de amadurecimento e maturação durante o tempo que intervém.” Essa percepção antiga não está longe do que mais tarde foi descrita e corroborado pelo estudo de pacientes com amnésia retrógrada, onde memórias recentes são mais comumente afetadas do que memórias remotas. Sobre esta observação, o psicólogo francês Théodule Ribot levantou a hipótese de que as memórias mais antigas são menos propensas a interferências, conhecida como a *Lei de Ribot*. Alguns anos mais tarde, em 1900, a primeira hipótese de consolidação foi desenvolvida por Müller e Pilzecker, que propuseram que a aprendizagem não induz memórias instantâneas e permanentes, mas que a consolidação é dependente do tempo (LECHNER *et al.*, 1999). Ela ganhou pouca atenção na época e foi somente com o trabalho de Duncan em 1949 que a consolidação da memória iria ressurgir como um tema de interesse dentro da comunidade científica (McGAUGH, 2000). Nos anos que se seguiram, inúmeros estudos adicionais lançariam luz sobre a consolidação da memória (McGAUGH, 2000; DUDAI, 2004).

Dessa forma, a consolidação da memória pode ser dividida em *consolidação sináptica*, ou rápida, e *consolidação de sistemas*, ou prolongada (fig. 3).

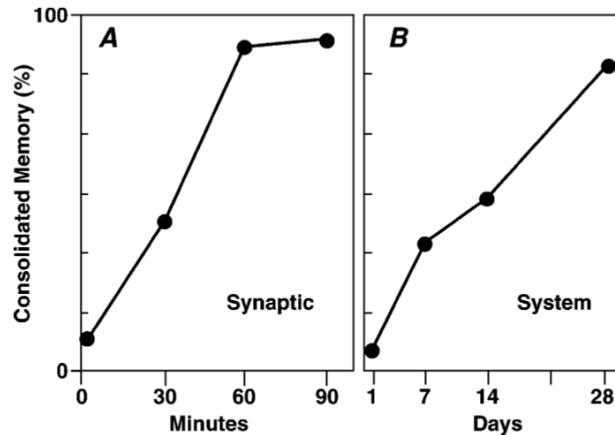


Figura 3. Tipos de consolidação (retirado de DUDAI, 2004). A – consolidação sináptica ou rápida e B – consolidação sistêmica ou prolongada.

1.3.1 Consolidação sináptica

As sinapses são plásticas e a força sináptica pode ser alterada pela aprendizagem. Essas mudanças podem durar minutos, horas ou uma vida inteira. Desde um simples invertebrado como a *Aplysia*, com um sistema nervoso composto de cerca de 20 000 neurônios, até vertebrados mais complexos, os elementos constitutivos da consolidação sináptica são evolutivamente conservados entre as espécies (KANDEL, 2014). Esse processo é dependente de diversos processos celulares: modificações pós-tradução de proteínas sinápticas, ativação de fatores de transcrição, modulação da expressão gênica nas sinapses e no corpo celular, além da reorganização de proteínas sinápticas incluindo receptores de membrana e elementos do citoesqueleto (DUDAI, 2004). Qualquer interferência que prejudica esses processos de estabilização impedirá a formação de uma memória duradoura (FRANKLAND & BONTEMPI, 2005).

Resumidamente, a consolidação sináptica é definida como a estabilização de novas memórias ao longo do tempo, geralmente na escala de tempo de 4 a 8 horas (NADER *et al.*, 2010).

1.3.2 Consolidação sistêmica

Enquanto a consolidação sináptica ocorre rapidamente e ao nível celular, memórias que sofrem consolidação sistêmica envolvem a reorganização de memórias de longo prazo

através de circuitos e pode demorar dias ou semanas para se consolidar para modelos de mamíferos não humanos e anos a décadas para os seres humanos (NADEL, 2007).

Foi postulado a partir de estudos iniciais envolvendo lesões ou trauma cerebral resultando em amnésia, incluindo o famoso caso do paciente H.M. que tinha sido submetido à remoção bilateral do hipocampo, que o lobo temporal medial era importante na consolidação de memórias de curta duração em longa duração ao nível de sistemas. Isso levou primeiramente à formulação da *Teoria Padrão da Consolidação Sistêmica*, que supõe que o hipocampo desempenha um papel limitado pelo tempo no armazenamento de memórias antes de serem transferidas para o córtex e reorganizadas (NADEL, 2007; FRANKLAND & BONTEMPI, 2005). As conexões cortico-corticais são progressivamente fortalecidas com a reativação sucessiva da rede hipocampo-cortical, e eventualmente novas memórias são gradualmente integradas com memórias corticais pré-existent e tornam-se independentes do hipocampo para armazenamento e evocação (fig. 4).

Embora a teoria padrão tenha sido rápida e prontamente aceita, começaram a surgir alguns problemas que dariam origem a teorias alternativas. Por exemplo, a extensão da amnésia retrógrada varia de acordo com o método utilizado para induzir a amnésia. Lesões, choque eletroconvulsivo ou a interrupção da síntese proteica podem produzir resultados diferentes (NADEL, 2007). Não havia evidências que apoiassem a transferência de memórias da formação hipocampal para locais neocorticais (NADEL, 2007).¹

Em 1997, NADEL e MOSCOVITCH propuseram uma nova teoria, a *dos múltiplos traços* como alternativa ao modelo padrão, baseado principalmente na observação de que quando a formação hipocampal inteira foi danificada, a amnésia para a memória episódica foi extensa (FRANKLAND & BONTEMPI, 2005). NADEL e MOSCOVITCH (1997) argumentaram que as memórias são codificadas nas redes hipocampo-corticais e que a reativação dessas memórias leva à geração de múltiplos traços no hipocampo, que estão

¹ SQUIRE (2015) sugere que a ideia não seja que a memória não é literalmente transferida do hipocampo para o neocórtex, pois a informação é codificada no neocórtex ao mesmo tempo que é codificada no hipocampo na hora da aprendizagem. Em vez disso, mudanças graduais no neocórtex começam na hora da aprendizagem estabelecem memórias de longa duração estáveis ao aumentar a complexidade, distribuição e conectividade entre regiões corticais múltiplas.

ligados a redes corticais (fig. 5). A evocação de memórias episódicas contextualmente ricas depende das redes hipocampo-corticais, corroborado por WILTGEN *et al.*, (2010), e traços de memória no córtex são livres de contexto ou por natureza semânticas.

Esta teoria também não é perfeita, e o debate continua. Enquanto NADEL e MOSCOVITCH (1997) afirmam que o hipocampo fornece o contexto espacial e temporal, TENG e SQUIRE (1999) sugerem que o hipocampo não é repositório de longo prazo de mapas espaciais mentais. Eles relatam que um paciente profundamente amnésico (chamado E.P.) com danos bilaterais extensos no lobo temporal medial, incluindo a formação hipocampal, conseguiu lembrar a disposição espacial do bairro em que ele vivia antes de sofrer a lesão, mas não conseguia lembrar detalhes relativos à vizinhança onde ele tinha morado nos últimos 6 anos, sugerindo que o hipocampo não é o repositório de longo prazo de mapas espaciais mentais. SQUIRE (2015) sugere que o hipocampo é uma estrutura envolvida na formação de memórias de longa duração, mas não é necessária para a recuperação de memórias espaciais muito remotas.

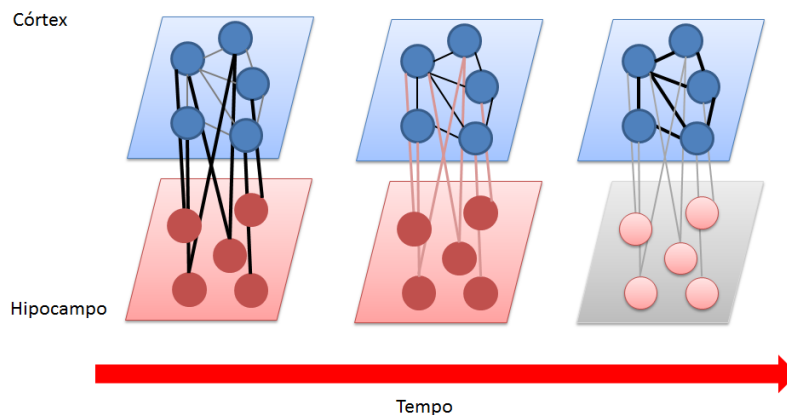


Figura 4. Esquema ilustrando o modelo padrão da consolidação da memória, que postula que as memórias ficam independentes do hipocampo e ficam representadas no córtex com o passar do tempo.

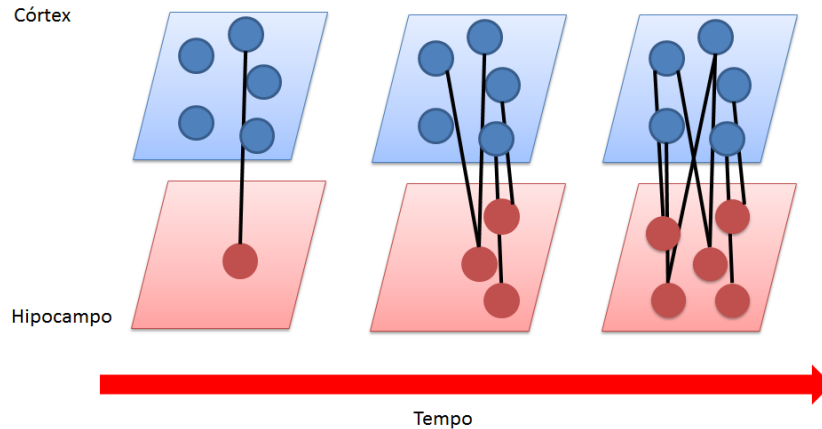


Figura 5. Esquema ilustrando a teoria dos múltiplos traços, em que as memórias episódicas antigas ainda necessitam do hipocampo para sua evocação.

1.5. Precisão e Generalização

Memórias parcialmente generalizadas permitem que os animais se adaptem a um ambiente em constante mudança, permitindo-lhes responder rapidamente a estímulos que se assemelham a uma experiência anterior. Quando os animais passam por uma experiência prejudicial similar eles são alertados para perigos potenciais e reagem de acordo. Assim, a generalização de memórias de medo é uma adaptação protetora, mas a generalização excessiva pode levar à transtornos de ansiedade, como o Transtorno de Ansiedade Generalizada (LISSEK *et al.*, 2014) e TEPT (MAHAN & RESSLER, 2012) em humanos, nessas patologias, que dicas de um ambiente seguro podem provocar pânico e revivescência de eventos traumáticos.

Estudos envolvendo generalização de medo usando modelos animais demonstraram que uma resposta de medo adquirida é dependente do contexto quando os animais são testados após um curto intervalo de tempo (por exemplo, 2 dias após o treino) em um contexto novo (LYNCH *et al.*, 2013). Porém, quando são testados após um intervalo mais longo, os roedores *frezam*² equivalentemente nos dois contextos. (WILTGEN & SILVA, 2007).

² *Freezing* (ou congelamento) é uma resposta defensiva inata quantificável em que há ausência de movimentos da cabeça e corpo, exceto pela respiração, e é uma variável mensurável usada para quantificar o medo (QUILLFELDT, 2006 p.16).

Usando nosso protocolo, durante o treino os ratos aprendem a associar um contexto específico (estímulo condicionado) a dois choques (estímulo incondicionado) de 0,7mA nas patas, e essa memória de medo se mantém específico ao contexto e dependente do hipocampo por um período de tempo. Quando testados em pontos de tempo remotos, os animais tendem a generalizar a memória de medo a outros contextos, com outras dicas (KIM & FANSELOW, 1992; WILTGEN & SILVA, 2007) ao *freezarem* tempos equivalentes nos contextos original e novo.

As memórias neste ponto tornam-se menos precisas, mais genéricas (WILTGEN & SILVA, 2007) e independentes do hipocampo (KIM & FANSELOW, 1992). De acordo com WINOCUR *et al.*, (2007), este fenômeno pode ser explicado pela “transferência” de informações armazenadas do hipocampo para estruturas corticais, perdendo especificidade contextual e tornando-se mais esquemática com o passar do tempo. Em outras palavras, a memória de medo se torna consolidada sistemicamente.

1.6. Adolescência: um período de mudanças

A adolescência é um estágio do desenvolvimento altamente conservado, tanto comportamental quanto fisiologicamente, durante o qual os mamíferos devem atender às pressões evolutivas associadas à maturação sexual e fazer a transição da dependência dos pais para a independência. É em última instância um período de transição da infância para a idade adulta.

O cérebro adolescente está em fluxo, sofrendo numerosas alterações de maturação nas regiões mesocorticolímbicas (SPEAR, 2004) tais como alterações volumétricas específicas do sexo no hipocampo (GIEDD *et al.*, 1996) e amígdala (KOSHIBU *et al.*, 2004) e remodelação e redução do tamanho do PFC (VAN EDEN *et al.*, 1990), estruturas que são críticas na modulação da memória. Em mamíferos, o desenvolvimento do cérebro é caracterizado por mielinização progressiva (CASEY *et al.*, 2000; PAUS *et al.*, 2001) e processos de poda (DE BELLIS *et al.*, 2001) que ocorrem durante a puberdade (KOSHIBU *et al.*, 2004).

1.6.1. Dimorfismo sexual neuromorfológico na adolescência

KOSHIBU *et al.* (2004) estudaram os volumes de estruturas cerebrais associados à transtornos psiquiátricos em humanos e em camundongos transgênicos peripubertais (~P30) e descobriram que houve um crescimento total do cérebro da peripuberdade à idade adulta em machos e fêmeas. Além das diferenças acima mencionadas no volume do hipocampo e da amígdala, o volume ventricular lateral permanece relativamente constante em fêmeas do ~P30 a ~P90, enquanto há uma diminuição no volume nos ventrículos lateral e terceiro para machos das mesmas idades. Globalmente, o tamanho do cérebro aumenta na adolescência e os cérebros masculinos são aproximadamente de 9 a 12% maiores do que das fêmeas. Há maior mielinização em fêmeas adultas e mais matéria cinzenta em machos adultos, uma divergência na morfologia que começa na adolescência (DE BELLIS *et al.*, 2001). Além disso, os cérebros das fêmeas geralmente tendem a amadurecer mais rapidamente do que dos machos (SPEAR, 2000), atingindo seu pico de volume cerebral mais cedo (LENROOT & GIEDD, 2010). Na adolescência também a densidade neuronal no córtex pré-frontal medial ventral sofre redução (a partir do ~P35), sendo que essa redução é mais pronunciada em fêmeas (MARKHAM *et al.*, 2007).

1.7. Hormônios sexuais e sua relação com a generalização da memória

A generalização da memória é um sintoma fundamental dos transtornos de ansiedade, nos quais as mulheres representam uma porcentagem desproporcionalmente grande. Nos seres humanos, as mulheres são aproximadamente 60% mais propensas a desenvolver o TEPT do que os homens (WANG *et al.*, 2005). Este efeito pode ser mediado, em parte, por diferenças hormonais. Embora haja um grande corpo de literatura sobre a generalização do medo em mulheres, aqueles sobre modelos animais são relativamente escassos. Mesmo assim, há um crescente corpo de literatura sobre os efeitos dos hormônios sexuais sobre a generalização da memória em roedores (JASNOW *et al.*, 2016). Os efeitos do estrogênio em ratos adultos machos e fêmeas são complexos. LYNCH *et al.*, (2013) mostraram que as fêmeas adultas ovariectomizadas e sem substituição hormonal foram

capazes de distinguir entre contextos de tarefa de esquiva inibitória no dia 5 após o treino, enquanto aquelas que receberam 17β -estradiol não. Os machos neste ponto de tempo foram capazes de discriminar entre contextos, sugerindo que a generalização do medo ocorre mais rapidamente em fêmeas e é mediada, em parte, por estrogênios que ativam receptor de estrogênio beta ($ER\beta$), ao invés do receptor de estrogênio alfa ($ER\alpha$) (LYNCH *et al.*, 2014). Por outro lado, o estrogênio mantém as memórias precisas em ratos machos que produzem este hormônio naturalmente através da aromatização de testosterona (LYNCH *et al.*, 2016). Estradiol atua na região dorsal do CA1 do hipocampo dorsal, aumentando a sinalização glutamatérgica pós-sináptica (JASNOW *et al.*, 2016) e enquanto ambos os ERs são expressos no hipocampo e no córtex pré-frontal, os $ER\beta$ s são mais amplamente distribuídas nessas regiões (LYNCH *et al.*, 2016). As densidades destes receptores em ratos adolescentes tardios (P42-49) são desconhecidas.

2. JUSTIFICATIVA

Experimentos anteriores do nosso laboratório sugerem que ratos machos de diferentes idades possuem curvas de generalização da memória diferentes. Animais adultos generalizam a memória aproximadamente um mês após o condicionamento (DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2012), enquanto animais de meia-idade e adolescentes tardios generalizam aos 2 e 14 dias, respectivamente (CRESTANI, 2011), consistente com estudos em humanos saudáveis, em que adolescentes demonstraram maior generalização do medo do que adultos (LAU *et al.*, 2011).

O que nos questionávamos é se a dinâmica da consolidação sistêmica poderia ser diferente em animais adolescentes (~P42, ver McCUTCHEON, 2009) de diferentes sexos.

O desenvolvimento do sistema nervoso se estende após o nascimento em muitos mamíferos. Escolhemos esta fase de desenvolvimento porque durante a adolescência o córtex medial pré-frontal e o hipocampo passam um grande remodelamento morfológico e funcional (PIGNATELLI 2006; McCORMICK 2008), o que poderia influenciar na dinâmica (i.e., velocidade com as memórias tornam-se independentes do hipocampo) da consolidação sistêmica das memórias. Além disso, alguns trabalhos recentes sugerem que a

consolidação sistêmica seria também mediada por diferenças hormonais em animais de diferentes sexos. O efeito facilitatório do estrogênio na memória é bem conhecido (BRAILOIU *et al.*, 2007 DUARTE-GUTERMAN *et al.*, 2015 FOSTER, 2012; PROSSNITZ *et al.*, 2007) e também há dimorfismo sexual na consolidação de memórias aversivas (BRESLAU, 2009; GOLDSTEIN *et al.*, 2010; KESSLER *et al.*, 2009; McLEAN *et al.*, 2011; TOLIN & FOA, 2006). Dessa forma, achamos relevante a avaliação da consolidação sistêmica (precisão da memória e dependência hipocampal) em animais adolescentes (42dias) machos e fêmeas.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a dinâmica temporal do processo de generalização e avaliar a dependência hipocampal em ratos adolescentes machos e fêmeas.

3.1. Objetivos específicos

1. Avaliar a precisão da memória utilizando o contexto original em que os ratos foram treinados ou em um contexto novo, testados em diferentes intervalos de tempo (2, 7, 14, e 21 dias) após o treino;
2. Avaliar a precisão da memória ao verificar a diferença na resposta de congelamento entre ratos adolescentes machos e fêmeas no que se diz ao intervalo de tempo (2, 7, 14 ou 21 dias).
3. Verificar o tempo pelo qual as memórias do condicionamento aversivo contextual permanecem dependentes do hipocampo em animais adolescentes machos e fêmeas (teste 14, 21, 28 e 56 dias após o treino no contexto A).

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Ratos *Wistar* machos e fêmeas adolescentes, pesando entre 100-220g. Estes animais são mantidos em caixas moradia com 4 ou 5 ratos cada, com água e comida *ad libitum*, à temperatura ambiente entre 20°C-22°C e ciclo 12 horas claro/12 horas escuro.

4.2. Escolha da idade

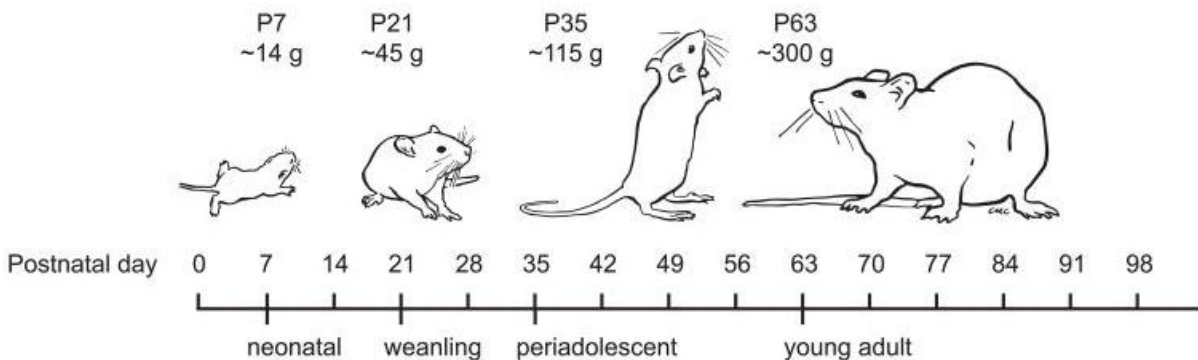


Figura 6. Diferentes estágios do desenvolvimento do rato (retirado de McCUTCHEON & MARINELLI, 2009).

Pode ser difícil caracterizar os limites precisos durante os quais a transição para a adolescência começa. Da mesma forma, determinar quando um adolescente amadurece em um adulto jovem pode ser igualmente difícil (SPEAR, 2000).

A puberdade é definida como o início da maturidade sexual, que ocorre aproximadamente em P32-34 em fêmeas e P42-48 em machos, porém pode haver variação considerável entre os indivíduos, variando de P40 a P76 em ratos machos (LEWIS *et al.*, 2002). SPEAR (2000) não equivale a adolescência com a puberdade mas afirma que, embora "se possa definir a puberdade em termos neuroendocrinológicos específicos ... a adolescência é, em sua essência, um período de transições e não um momento de realização".

Os estudos diferem quanto à faixa etária da adolescência em ratos. TIRELLI *et al.* (2003) classificam os adolescentes como idades variando de P34-59 enquanto SPEAR

(2000) considera que os adolescentes estão aproximadamente dentro de P28-42 e VALINSKAYA & SPEAR (2005) consideram adolescentes tardios como P42. Nós escolhemos treinar animais em aproximadamente esta idade (P42).

4.3. Procedimentos cirúrgicos

São fixadas cânulas intracerebrais e, pelo meio destas, são infundidos os fármacos através de uma agulha mais fina ("mizzy", de calibre 30) que é introduzida dentro da primeira.

Cada animal anestesiado é cuidadosamente colocado em um Aparelho Estereotáxico (Fabricação: *David Kopf*, modelo 1404), e a superfície de seu crânio exposta mediante incisão sagital com bisturi N° 20 ou 21. Uma craniotomia bilateral é feita com o emprego de uma broca odontológica nos locais correspondentes às medidas AP e LL da estrutura em questão. As coordenadas serão adaptadas devido à diferença no tamanho dos animais. Coordenadas a partir do Bregma: AP - 3,0 mm, LL \pm 2,4 mm e DV -1,3 mm.

Uma cânula de aço inoxidável (manufaturada a partir de agulha com diâmetro interno de 0,7 mm, calibre ou *gauge* 22, e diâmetro interno de 0,3 mm), presa à torre móvel do estereotáxico, é introduzida cuidadosamente através de cada um desses orifícios feitos na calota craniana e baixada lentamente até encostar na dura-máter – onde é obtida a coordenada DV para que a cânula seja introduzida no encéfalo até a ponto de interesse. As cânulas são, então, fixadas nesta posição com acrílico dentário, aplicado ainda quando na forma de um líquido espesso, que deixaremos secar. O acrílico é trabalhado para formar uma espécie de capacete sobre o osso do crânio, fechando a janela óssea produzida. As cânulas mantêm-se fixas na posição desejada por tempo suficiente após a cirurgia.

A anestesia foi adaptada para animais adolescentes, 100 mg/ml/kg de ketamina e 20 mg/ml/kg de xilazina (baseado em FLECKNELL, 2015; SHARP & VILLANO, 2012).

4.4. Fármacos

Muscimol: é um alcalóide psicoativo, agonista seletivo dos receptores GABA_A com efeitos hipnótico e dissociativos. Liga-se no sitio de ligação do GABA e também é agonista

parcial do receptor GABA_C. Quando administrado localmente está associado com supressão da atividade neuronal sendo, dessa forma, utilizado para inativar temporária e reversivelmente a estrutura-alvo.

Veículo: Tampão fosfato salino (PBS).

4.5. Infusões

O muscimol e seu veículo serão infundidos bilateralmente 15 minutos antes do teste. A concentração da dose utilizada será de 1 µg/µl e o volume infundido será de 0,5 µg/lado.

4.6. Descrição dos experimentos

4.6.1 Curva de generalização

De acordo com achados prévios do nosso laboratório, as memórias podem manter sua força (intensidade), sem manter sua precisão (detalhamento). Assim, para verificarmos a duração da precisão da memória, os animais foram treinados no Condicionamento Aversivo Contextual (CAC) e testados 2, 7, 14 e 21 dias após, ou no mesmo contexto em que foram treinados ou em um contexto novo (fig. 7). Para uma memória ser considerada precisa, os animais devem apresentar a resposta de medo quantificável (congelamento ou *freezing*) significativamente mais baixa no contexto onde o animal nunca esteve (contexto novo).

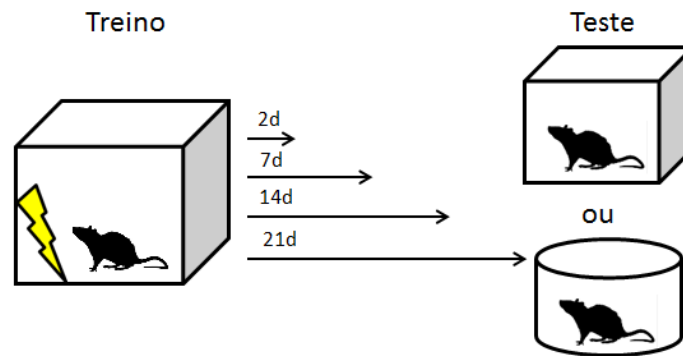


Figura 7. Esquema ilustrando o protocolo dos experimentos.

4.6.2. Dependência hipocampal

Para verificarmos a dependência hipocampal, os ratos serão treinados e testados 14, 21 e 28 dias após, no mesmo contexto onde haviam recebido o choque. Sete dias antes do teste eles serão submetidos a uma cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas no hipocampo dorsal. Quinze minutos antes do teste, os animais serão infundidos com muscimol (0,5µl/lado) ou seu veículo e testados no contexto original 5 dias depois. 24h depois do teste serão retestados no mesmo contexto, sem ação do fármaco (fig. 8).

Devido a limitações de tempo, realizamos somente o experimento onde as fêmeas foram testadas 14 dias após o treino. Pretendemos dar continuidade a esse experimento.

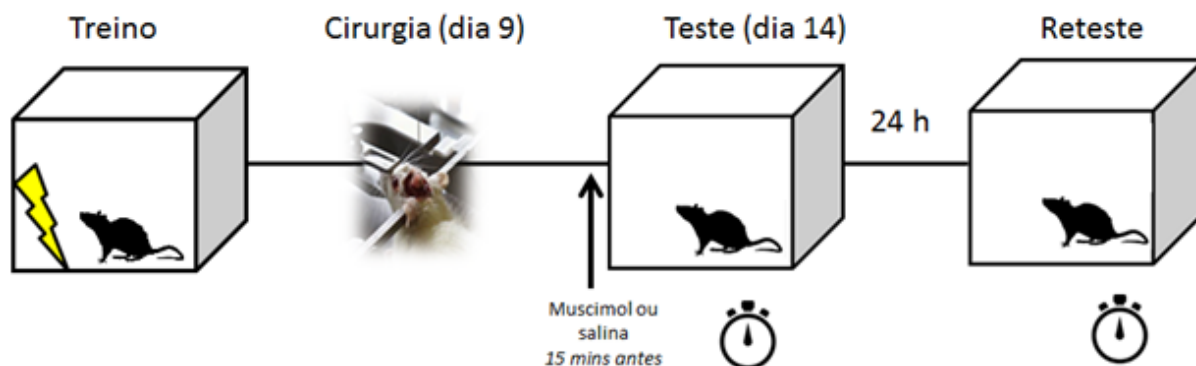


Figura 8. Esquema ilustrando o protocolo do experimento da dependência hipocampal. O freezing foi quantificado no teste e reteste.

4.7. Procedimentos comportamentais

TREINO: foi realizado no CAC seguindo o protocolo padrão do nosso laboratório (fig. 9). O CAC foi utilizado para testar a precisão nos grupos *contexto original* 2, 7, 14 e 21 dias após o treino (curva de generalização) e a dependência hipocampal 14 dias após o treino (dependência hipocampal).

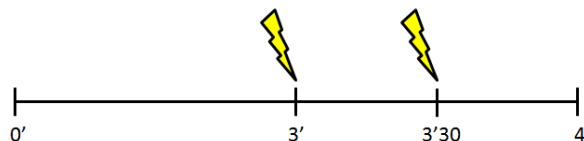


Figura 9. Protocolo padrão (treino)

Os ratos receberam 2 choques de 0,7mA, cada um com 2s de duração, separados por um intervalo de 30 segundos. Os animais exploraram a caixa por 3 minutos antes de receber o primeiro choque, e ficaram 30 segundos adicionais após receber o segundo choque. Aos 4 minutos foram retirados da caixa e retornados à caixa de moradia. Todos os animais de ambos os experimentos foram treinados no CAC.

TESTE: 2, 7, 14 e 21 dias após, foram testados no *contexto original*, onde haviam levado choque, ou no *contexto novo*, para avaliar a precisão da memória (experimento 1). 14, 21 e 28 dias após serão testados no *contexto original* (experimento 2).

Os animais foram colocados na caixa por 4 minutos onde o *freezing* foi quantificado.

RETESTE: Para o experimento 2, os animais serão retestados 24h depois sem ação do muscimol ou PBS.

4.8. Descrição dos contextos

CONTEXTO TREINO (ORIGINAL): caixa bege com dimensões (20x25x22cm), paredes laterais e posterior de fórmica e parede frontal de acrílico onde fica uma luminária externa acesa; com ruído de fundo (ar condicionado).

CONTEXTO NOVO (ALTERNATIVO): Caixa branca com 2/3 das dimensões do contexto treino, com assoalho de fórmica, sem luz, sem cheiro, sem ruído de fundo e em outra parte da sala de comportamento (com dicas espaciais diferentes).

4.9. Estatística

Com exceção do teste da dependência hipocampal (fig.21) e do teste machos 21 dias (fig.13), a estatística usada nos os experimentos é do tipo paramétrica, pois os dados

se distribuem normalmente. Para avaliar se os dados se distribuem normalmente, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Constatada a existência de dados paramétricos, as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste t de Student de amostras independentes, e no caso não-paramétrica os grupos foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney para amostras independentes. Foram considerados como significantes valores de $P < 0,05$.

5.RESULTADOS

Experimentos anteriores do nosso laboratório demonstraram que ratos machos adolescentes apresentam uma curva de generalização acelerada quando comparados a animais adultos (ver figura 13, CRESTANI, 2011). Nesse trabalho, demos continuidade a esse estudo, avaliando a precisão da memória não apenas em ratos adolescentes machos, mas também em fêmeas.

Além disso, incluímos mais pontos (isto é, dia em que os animais foram testados após o teste) na curva de generalização da memória.

5.1. Avaliação da curva de generalização da memória

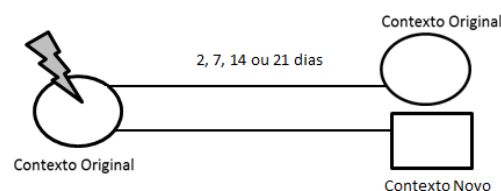


Figura 10. Desenho experimental para os experimentos da curva de generalização.

Como se pode observar na figura 11, os gráficos demonstram que com 2 dias os ratos adolescentes machos distinguem os contextos original e novo, porém 14 dias após o treino a memória torna-se generalizada.

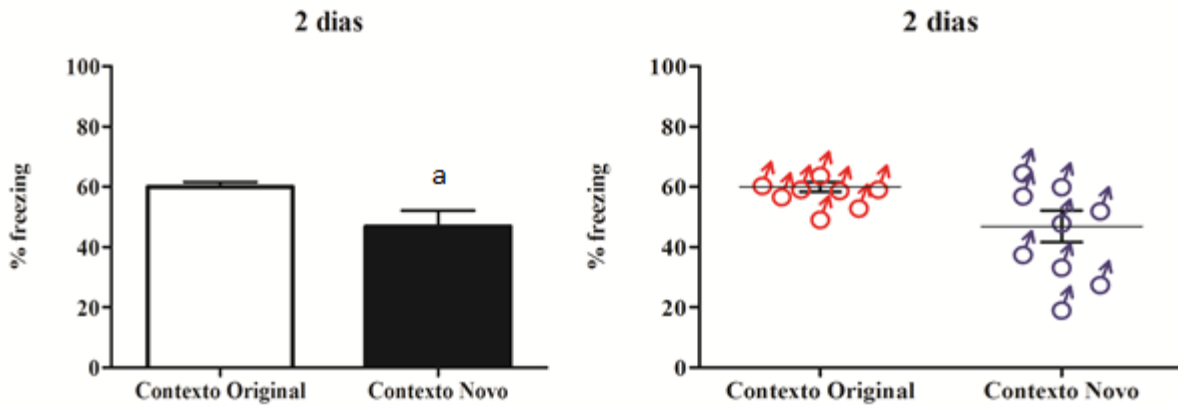


Figura 11. Dois dias após o treino os machos distinguem os contextos original e novo, a memória é precisa. Tempo percentual de *freezing* para ratos adolescentes machos na tarefa de CAC quando testados no contexto original ou novo. Dados expressos como média \pm E.P.M. do % de tempo. Teste 2 dias após o condicionamento: grupo testado no contexto original N=8 e no contexto novo N=9. À direita, gráfico de dispersão.

a: há diferença significativa entre os grupos ($P= 0,038622$ - teste t de Student para amostras independentes). (dados retirados de CRESTANI, 2011).

Corroborando esses resultados, quando testamos os ratos machos adolescentes em um ponto intermediário da curva, aos 7 dias pós-treino, eles ainda demonstraram precisão da memória.

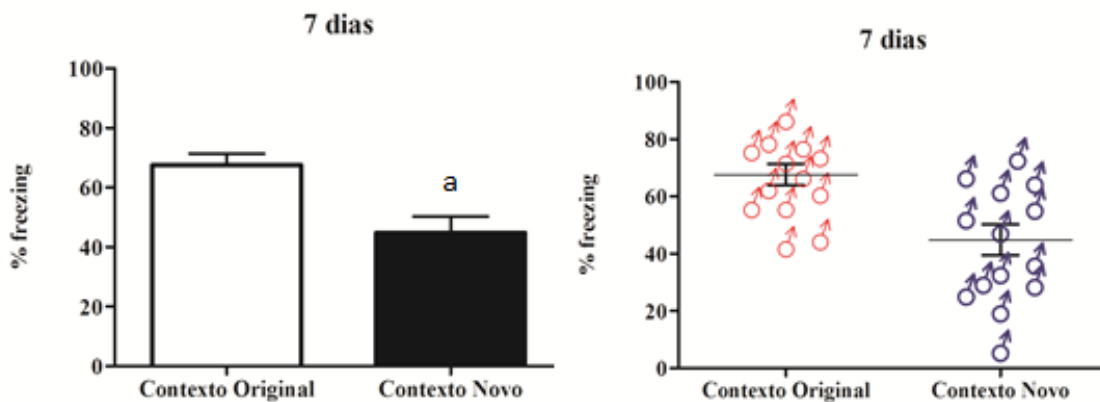


Figura 12. Sete dias após o treino os machos distinguem os contextos original e novo, a memória é precisa. Tempo percentual de *freezing* para ratos adolescentes machos na tarefa de CAC quando testados no contexto original ou novo. Dados expressos como média \pm E.P.M. do % de tempo. Teste 7 dias após o condicionamento: grupo testado no contexto original N=13 e no contexto novo N=14. À direita, gráfico de dispersão.

a: há diferença significativa entre os grupos ($P= 0,002$ - teste t de Student para amostras independentes).

14 dias após o treino, a memória é generalizada.

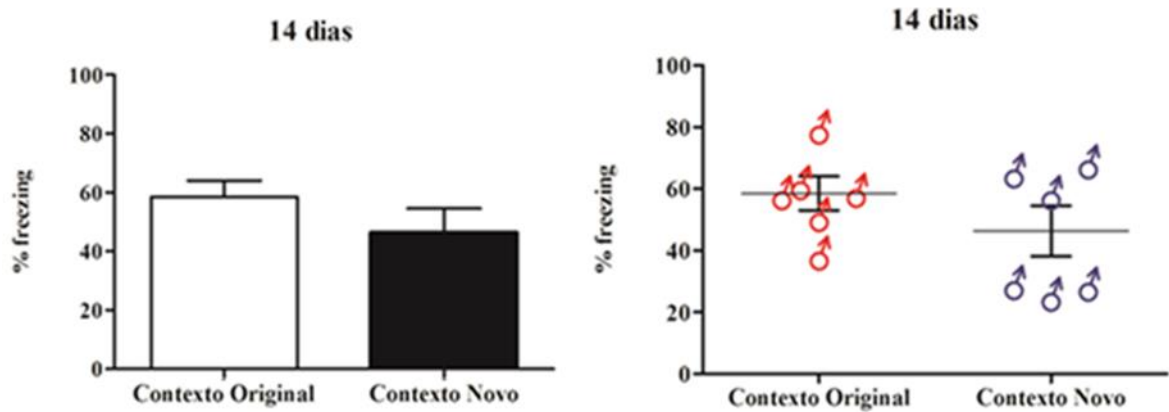


Figura 13. Quatorze dias após o treino a memória é generalizada. Tempo percentual de *freezing* para ratos adolescentes machos na tarefa de CAC quando testados no contexto original ou novo. Dados expressos como média \pm E.P.M. do % de tempo. Teste 2 dias após o condicionamento: grupo testado 14 dias após o treino no contexto treino N=6 e no contexto alternativo N=6. ($P=0,248494$ teste *t* de Student para amostras independentes). À direita, gráfico de dispersão. (dados retirados de CRESTANI, 2011).

21 dias após do treino, a memória é precisa novamente.

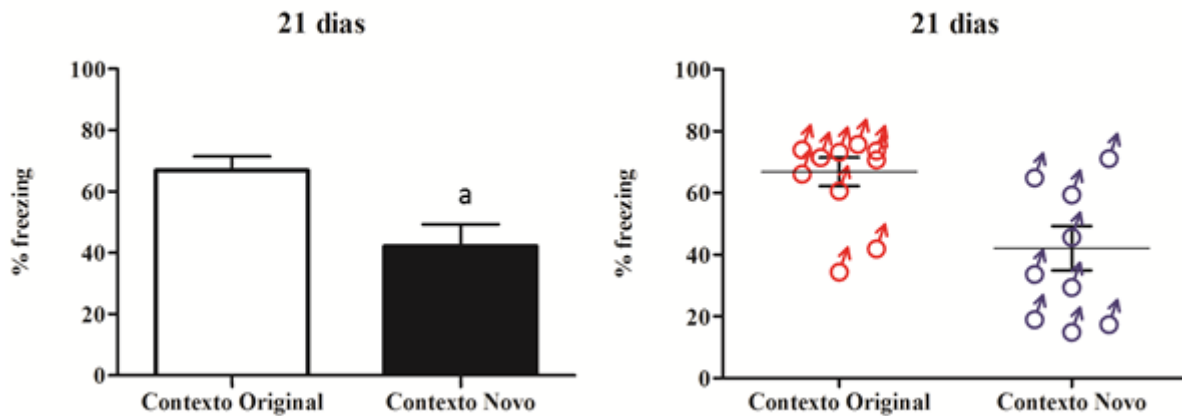


Figura 14. Vinte e um dias após o condicionamento os machos distinguem os contextos original e novo, a memória é precisa. Tempo percentual de *freezing* para ratos adolescentes machos na tarefa de CAC quando testados no contexto original ou novo. Dados expressos como média \pm E.P.M. do % de tempo. Teste 21 dias após o condicionamento: grupo testado no contexto original N=10 e no contexto novo N=9. À direita, gráfico de dispersão.

a: há diferença significativa entre os grupos ($P=0,0057$ teste de Mann-Whitney para amostras independentes).

Nos próximos experimentos, avaliamos a precisão da memória em ratos adolescentes fêmeas. Observamos que quando testadas 2, 7 e 14 dias após o treino as fêmeas mantêm a memória precisa, e 21 dias após a memória é generalizada.

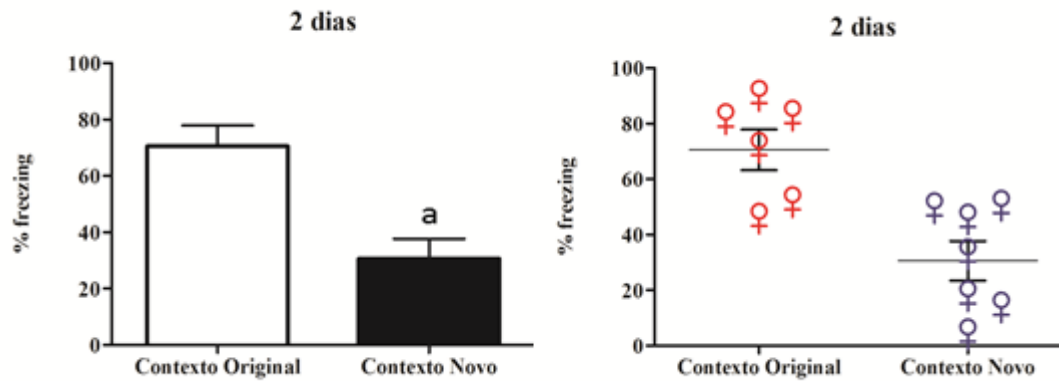


Figura 15. Dois dias após o condicionamento as fêmeas distinguem os contextos original e novo, a memória é precisa. Tempo percentual de *freezing* para ratos adolescentes fêmeas na tarefa de CAC quando testadas no contexto original ou novo. Dados expressos como média \pm E.P.M. do % de tempo. Teste 2 dias após o condicionamento: grupo testado no contexto original N=6 e no contexto novo N=7. À direita, gráfico de dispersão.
a: há diferença significativa entre os grupos ($P= 0,003$ - teste t de Student para amostras independentes).

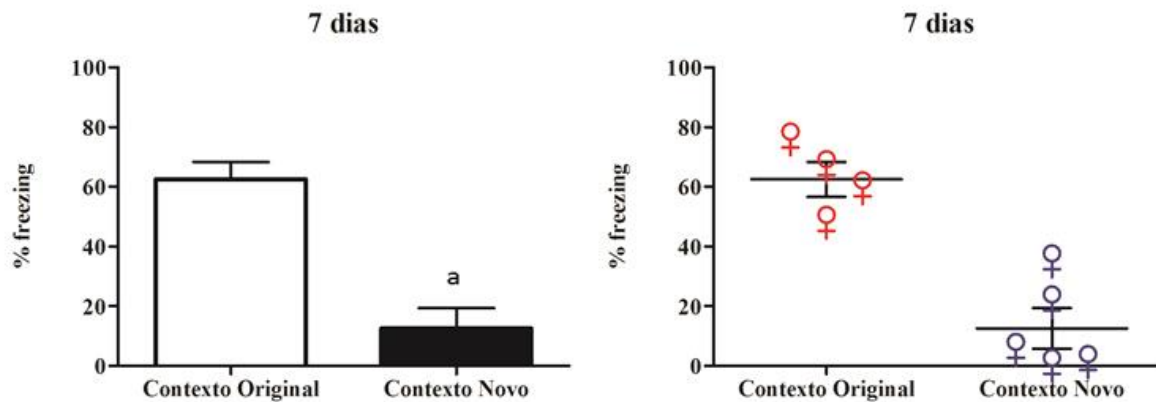


Figura 16. Sete dias após o condicionamento as fêmeas distinguem os contextos original e novo, a memória é precisa. Tempo percentual de *freezing* para ratos adolescentes fêmeas na tarefa de CAC quando testadas no contexto original ou novo. Dados expressos como média \pm E.P.M. do % de tempo. Teste 7 dias após o condicionamento: grupo testado no contexto original N=4 e no contexto novo N=5. À direita, gráfico de dispersão.
a: há diferença significativa entre os grupos ($P= 0,001$ - teste t de Student para amostras independentes).

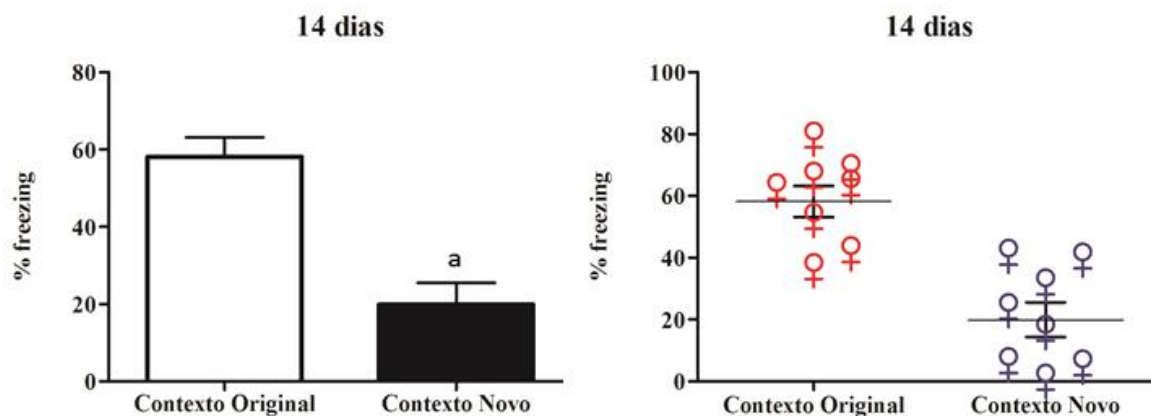


Figura 17. Quatorze dias após o condicionamento as fêmeas distinguem os contextos original e novo, a memória é precisa. Tempo percentual de *freezing* para ratos adolescentes fêmeas na tarefa de CAC quando testadas no contexto original ou novo. Dados expressos como média \pm E.P.M. do % de tempo. Teste 14 dias após o condicionamento: grupo testado no contexto original N=8 e no contexto novo N=8. À direita, gráfico de dispersão.

a: há diferença significativa entre os grupos ($P= 0,0002$ - teste t de Student para amostras independentes).

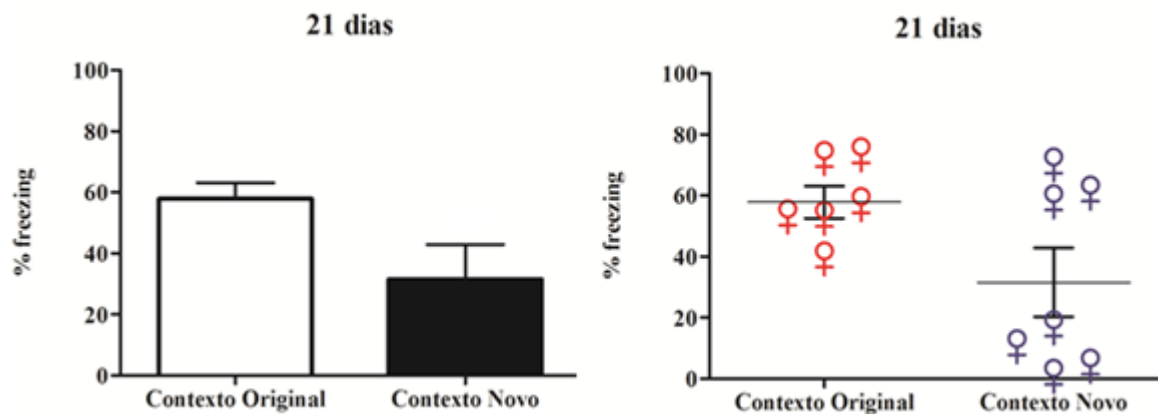


Figura 18. Vinte e um dias após o condicionamento a memória é generalizada.

Tempo percentual de *freezing* para ratos adolescentes fêmeas na tarefa de CAC quando testadas no contexto original ou novo. Dados expressos como média \pm E.P.M. do % de tempo. Teste 21 dias após o condicionamento: grupo testado no contexto original N=6 e no contexto novo N=7. À direita, gráfico de dispersão. Não há diferença significativa entre os grupos ($P= 0,0726$ - teste t de Student para amostras independentes).

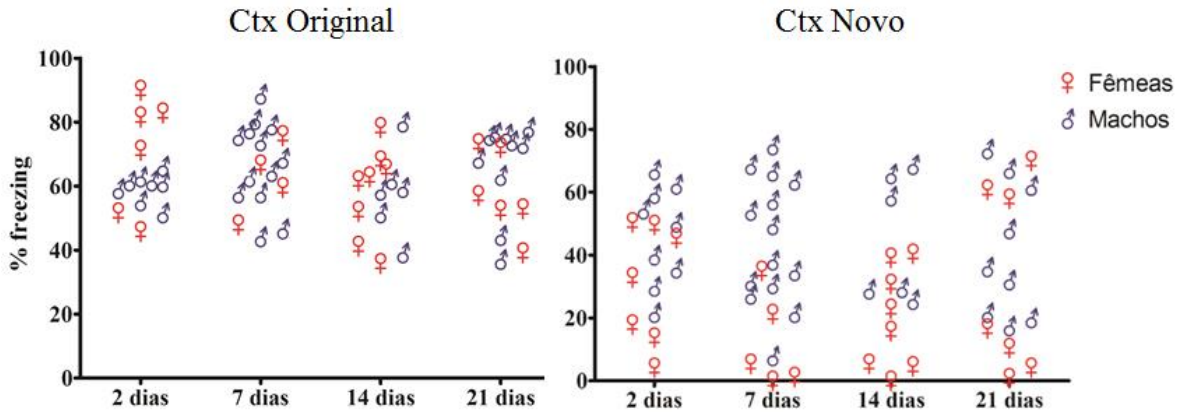


Figura 19. Gráfico de dispersão comparativo entre os intervalos de tempo.

Comparação entre o tempo percentual de *freezing* para ratos adolescentes machos e fêmeas na tarefa de CAC quando testados no contexto original e novo.

5.2. Avaliação da dependência hipocampal

As figuras 21 a 22 apresentam os resultados obtidos com o protocolo de dependência hipocampal com animais fêmeas.

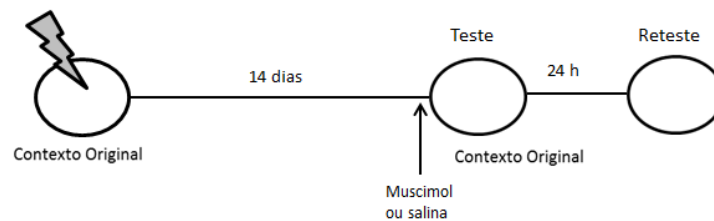


Figura 20. Desenho experimental para os experimentos da dependência hipocampal.

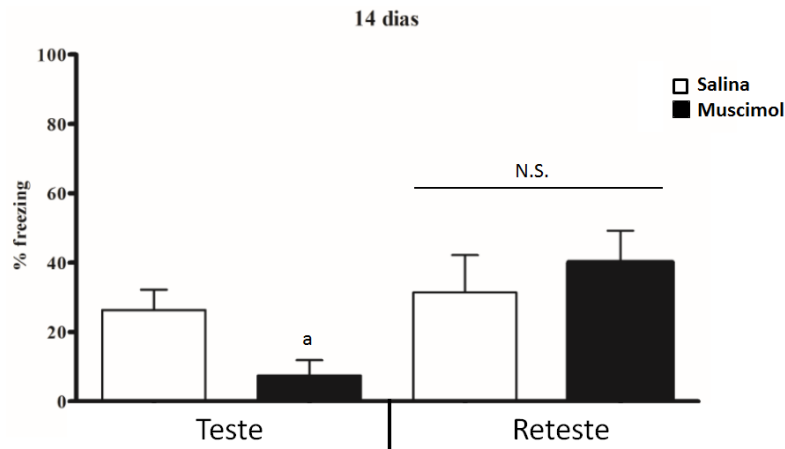


Figura 21. Teste: a inativação farmacológica do hipocampo com muscimol resultou em baixos níveis de *freezing*. Reteste: sem ação do muscimol, a memória aversiva é expressa em nível igual ao controle. Tempo percentual de *freezing* para ratos adolescentes fêmeas na tarefa de CAC quando

testadas no contexto original e retestadas 24h depois sem o efeito do muscimol. Dados expressos como média \pm E.P.M. do % de tempo. Teste 14 dias após o condicionamento: grupo controle (salina) N=7 e muscimol N=7. Esse resultado sugere que a memória ainda está dependente dessa estrutura 14 dias após o condicionamento

a: diferença significativa entre os grupos no teste (P= 0,0002 - teste de Mann-Whitney para amostras independentes)

N.S.: diferença não significativa no reteste (P= 0,555 - teste *t* de Student para amostras independentes).

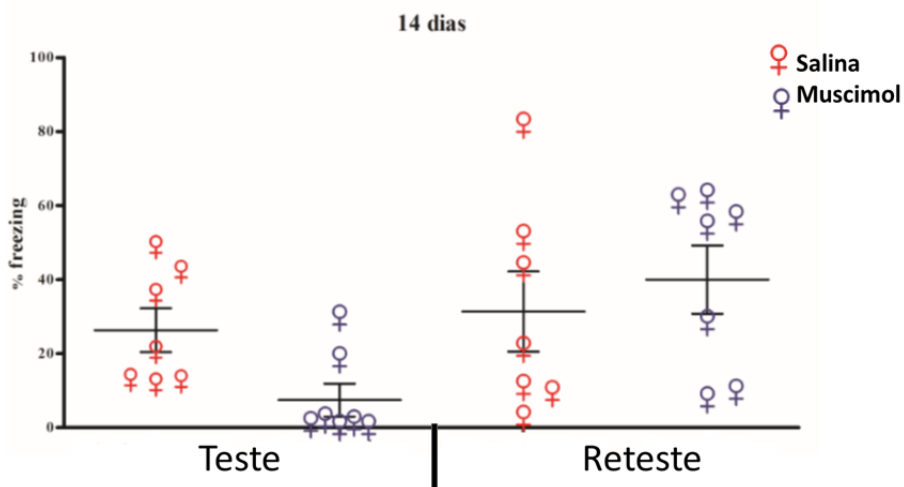


Figura 22. Gráfico de dispersão.

Sexo	Teste	Resultado	N
Precisão da Memória			
Fêmeas	2 dias	Diferenciam contextos; Original=70%, Novo=30%	6,7
	7 dias	Diferenciam contextos; Original=63%, Novo=13%	4,5
	14 dias	Diferenciam contextos; Original=58%, Novo=20%	8,8
	21 dias	Generalizam; Original=58%, Novo=31%	6,7
Machos	2 dias	Diferenciam contextos; Original=60%, Novo=47%	8,9
	7 dias	Diferenciam contextos; Original=67%, Novo=45%	13,14
	14 dias	Generalizam; Original=59%, Novo=46%	6,6
	21 dias	Diferenciam contextos; Original=66%, Novo=42%	10,9
Dependência Hipocampal			
Fêmeas	14 dias	Dependente do hipocampo; Muscimol=26%, Salina=7%	7,7

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos até agora.

4. DISCUSSÃO

Memórias contextuais tendem a perder detalhes com a passagem do tempo, tornando-se independentes do hipocampo; enquanto memórias detalhadas ainda

necessitam dessa estrutura para sua evocação (WILTGEN, 2010). A generalização, que nada mais é que a perda de precisão, é uma característica adaptativa importante da memória. No caso de adolescentes, a generalização da memória pode favorecer a sobrevivência, uma vez que são menos experientes e portanto, ao utilizar “margens de segurança” mais amplas em situações potencialmente perigosas, passam a ter uma melhor chance de sobrevivência. Em mamíferos, o cérebro sofre uma variedade de mudanças na adolescência, notavelmente no PFC (fig. 23), sistema mesocorticolímbico e amígdala, estruturas que são importantes na modulação de processos da memória. No entanto, o cérebro não é um sistema isolado; hormônios atuam sobre ele e influenciam nas funções cognitivas, entre os quais está a memória.

Dois tipos de alterações hormonais estão associados à adolescência, *adrenarche*, em que há um aumento da produção de hormônios adrenais, e *gonadarche*, em que o eixo hipotálamo-pituitária-gonadal é ativado (PIGNATELLI *et al.*, 2006), causando um aumento nos níveis de hormônios sexuais (SPEAR, 2000). Embora a puberdade e a adolescência não sejam conceitos intercambiáveis, esses se sobrepõem (SPEAR, 2000, SISK & ZEHR, 2005). CUTLER *et al.*, (1978) não acharam evidências de *adrenarche* em roedores, porém PIGNATELLI *et al.*, (2006) descobriram que as adrenais influenciaram o início da puberdade no rato.

Um achado interessante neste e no trabalho de CRESTANI (2011) é que os machos generalizaram a memória de medo aos 14 dias após o condicionamento ($P=0,248494$; $N=6$ *original*, 6 *novo*) mas não às 21 dias ($P=0,0057$; $N=10$ *original*, 9 *novo*). A razão para isso pode ter sido uma falha na abordagem, diferentes níveis de ansiedade basal entre os grupos³ durante o teste ou outra variável metodológica, e estas experiências teriam de ser replicadas no futuro, a fim de excluir falsos positivos. Embora não seja claro neste momento, é interessante especular sobre possíveis razões pelas quais isso pode ter acontecido, pois levanta uma série de perguntas intrigantes.

Uma hipótese é que ambos os grupos estavam em diferentes estágios da adolescência na hora do condicionamento, e portanto sob efeito de diferentes níveis de hormônios sexuais e em diferentes fases de maturação cerebral. Enquanto os ratos de

³ Embora isto seja improvável já que os ratos que foram utilizados neste estudo são da mesma cepa que CRESTANI usou em 2011.

ambos os grupos (14 e 21 dias) foram *testados* em torno da mesma idade (P61-63), CRESTANI (2011) *treinou* seus ratos quando tinham 47 a 49 dias de idade, ao passo que o grupo mais recente (21 dias) foi treinado à P42-P43. O fato de que esses grupos foram treinados durante a puberdade e testados no início da idade adulta torna possível que hormônios e diferenças morfofisiológicas possam estar impactando nestes resultados, embora de que maneira não está claro. Há numerosos estudos que suportam a ideia de que hormônios sexuais organizam circuitos cerebrais na adolescência (SISK & ZEHR, 2005; BLAKEMORE *et al.*, 2010) e alteram a plasticidade (FOY, 2011; KOLB *et al.*, 2012). Mais estudos com ratos adolescentes em tarefas de precisão de memória podem elucidar se as diferenças devidas a restrições de maturação no cérebro em desenvolvimento podem explicar esses resultados.

Um hormônio importante nos machos é a testosterona, com inúmeros efeitos potenciais (ver CELEC *et al.*, 2015 e SKUCAS *et al.*, 2013). VETTER O'HAGEN & SPEAR (2012) coletaram níveis séricos de testosterona em ratos adolescentes e viram que são relativamente baixos em P40, com aumentos significativos em P44-P48 e P48-P75. A testosterona atua na transcrição de BDNF, atenuando sua expressão em ratos adolescentes, ao contrário do seu efeito em adultos (PURVES-TYSON *et al.*, 2015). Alguns estudos sugerem que a testosterona facilita a aquisição em tarefas dependentes do hipocampo como no condicionamento contextual aversivo enquanto outros não (SKUCAS *et al.*, 2013), e que a administração de testosterona aumenta a densidade de espinhos em ambas as regiões CA1 e CA3 do hipocampo em ratos machos e fêmeas (EDINGER *et al.* 2004).

Esses, juntamente com estudos que indicam que os hormônios gonadais atuam sobre a plasticidade do córtex pré-frontal (KOLB *et al.*, 2012), que é uma das estruturas que modula a evocação (PRESTON & EICHENBAUM, 2013), podem em parte elucidar essa diferença na precisão da memória entre os dois grupos mencionados anteriormente (~P47 e ~P42), se não for um falso positivo.

A transmissão sináptica de GABA_B na região CA1 do hipocampo matura-se relativamente tarde (NURSE & LACAILLE, 1999), gradualmente maturando entre P35 e P45 (SPEAR, 2000). Este neurotransmissor inibidor atua sobre os receptores GABA_B, que

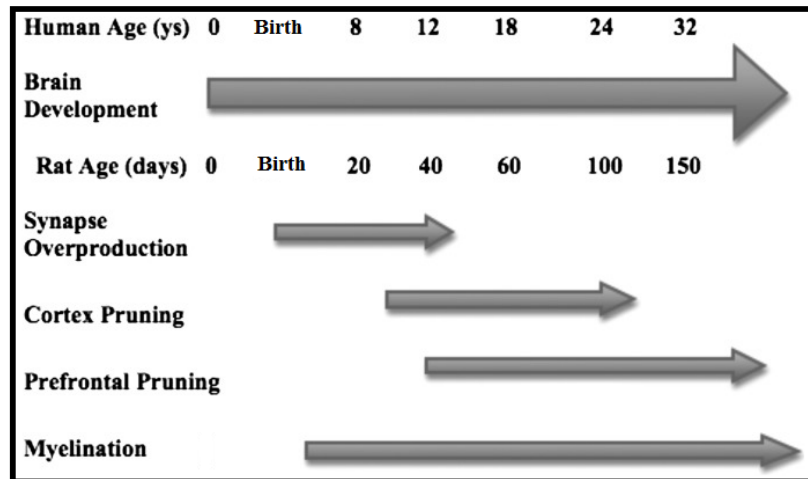


Figura 23. Desenvolvimento do córtex prefrontal (retirado de KOLB *et al.*, 2012).

regulam a inibição pré-sináptica e podem ser importantes na persistência, mas não na aquisição ou consolidação, de memórias contextualmente precisas (CULLEN *et al.*, 2014). Admitindo que possa haver variações individuais em ratos do mesmo sexo e idade, as médias dos grupos machos com idade P49-51, testados 2 dias após o condicionamento ($P=0,038622$; $N= 8$ original, 9 novo) e fêmeas com idade P44-45, também após 2 dias ($P=0,003$; $N= 6$ original, 7 novo) indicam que a memória continua precisa após 2 dias, embora as fêmeas apresentem um valor P bem menor.

Um experimento anterior do nosso laboratório mostrou que ratos adultos machos generalizam a memória de medo adquirida no CAC 28 dias após o treino, e que a evocação da memória não é prejudicada pelo muscimol naquele ponto do tempo, sugerindo que a memória não é mais dependente do hipocampo (DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2012), um resultado que é consistente com as observações de WILTGEN (2010). Aqui mostramos que fêmeas testadas 14 dias após o treino, infundindo o mesmo fármaco 15 minutos antes do teste ($0,5\mu\text{l/lado}$) são sensíveis ao seu efeito (fig. 21) indicando que a memória de medo ainda é dependente do hipocampo para a sua evocação (*teste*: $P= 0,0002$; *reteste*: $P=0,555$; $N=7,7$) e corrobora com nosso resultado de 14 dias do experimento da curva de generalização (fig. 17) em que a memória ainda é precisa ($P= 0,0002$; $N= 8$ original, 8 novo). O que resta a ser visto é se machos, que generalizaram no dia 14, terão um resultado similar.

Se nossos resultados futuros sugerirem que os machos treinados na adolescência tardia realmente generalizam mais cedo que as fêmeas, seria um achado interessante, uma vez que a literatura sobre a generalização em adultos suporta a ideia de que as fêmeas generalizam mais cedo (LYNCH *et al.*, 2013; JASNOW *et al.*, 2016), devido em parte à ação dos estrogênios e seus receptores na memória (LYNCH *et al.*, 2013, 2014; JASNOW *et al.*, 2016).

4. CONCLUSÕES

Nos experimentos da curva de generalização foi observado que ratos adolescentes machos e fêmeas (~P42 e ~P47), testados em diferentes intervalos de tempo (2, 7 e 14 e 21 dias) após o treino, tinham a memória precisa com 2 e 7 dias, sendo que aos 14 dias a memória tornava-se genérica nos machos enquanto nas fêmeas não. Aos 21 dias após o treino, os machos mantiveram a memória precisa enquanto nas fêmeas essa foi generalizada.

8. PERSPECTIVAS

1. Continuar com os experimentos da curva de generalização: testar 28 e 35 dias após o treino.
2. Continuar com os experimentos de dependência hipocampal: inativar farmalógicamente o hipocampo 14 dias após o treino para machos, 21, 28 e 35 dias após para machos e fêmeas.

REFERÊNCIAS

ALVARES L de O, Einarsson EÖ, Santana F, Crestani AP, Haubrich J, Cassini LF, Nader K, Quillfeldt JA. Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus*, 2012

BAYLISS DM, Jarrold C, Gunn DM, Baddeley AD. The complexities of complex span: explaining individual differences in working memory in children and adults. 2003

BLAKEMORE S-J, Burnett S, Dahl RE. The Role of Puberty in the Developing Adolescent Brain. *Human Brain Mapping*. 2010

BRAILOIU E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol*, 2007

BRESLAU N. The epidemiology of trauma, PTSD, and other posttrauma disorders. *Trauma Violence Abuse.*, 2009

CASEY BJ, Giedd JN, Thomas KM. Structural and functional brain development and its relation to cognitive development. *Biol Psychol.*, 2000

CELEC P, Ostatníková D, Hodosy J. On the effects of testosterone on brain behavioral functions. *Frontiers in Neuroscience*. 2015

CRESTANI AP. Precisão e suscetibilidade da memória a incorporação de informações em diferentes idades. Trabalho de conclusão de curso. 2011
Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/49225>. Acesso em março de 2016

CRONE EA, Wendelken C, Donohue S, van Leijenhorst L, Bunge SA. Neurocognitive development of the ability to manipulate information in working memory. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006

CULLEN PK, Dulka BN, Ortiz S, Riccio DC, Jasnow AM. GABA-mediated presynaptic inhibition is required for precision of long-term memory. *Learning & Memory*. 2014

CULLEN, P K, Dulka, BN, Ortiz, S, Riccio, D C, & Jasnow, AM. GABA-mediated presynaptic inhibition is required for precision of long-term memory. *Learning & Memory*, 2014

CUTLER Jr. GB, Glenn M, Bush M, Hodgen GD, Graham CE, Loriaux DL. Adrenarche: A survey of rodents, domestic animals, and primates. *Endocrinology*, 1978

DE BELLIS MD, Keshavan MS, Beers SR, Hall J, Frustaci K, Masalehdan A, Noll J, Boring AM. Sex differences in brain maturation during childhood and adolescence. *Cereb Cortex*, 2001

DIAMOND A. Executive Functions. *Annual review of psychology*, 2013

DUARTE-GUTERMAN P, Yagi S, Chow C, Galea LA. Hippocampal learning, memory, and neurogenesis: Effects of sex and estrogens across the lifespan in adults. *Horm Behav.*, 2015

DUDAI Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol.* 2004

EDINGER, KL, Lee, B, Frye, CA. Mnemonic effects of testosterone and its 5 α -reduced metabolites in the conditioned fear and inhibitory avoidance tasks. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2004

FLECKNELL PA Laboratory animal anaesthesia: a practical introduction for research workers and technicians, Fourth Edition. ed. Academic Press. 2015 (livro)

FOSTER TC. Role of estrogen receptor alpha and beta expression and signaling on cognitive function during aging. *Hippocampus.* 2012

FOY MR. Ovarian Hormones, Aging and Stress on Hippocampal Synaptic Plasticity. *Neurobiology of learning and memory.* 2011

FRANKLAND PW & Bontempi B, The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci.* 2005

GIEDD JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos A, Paus T, Evans AC, Rapoport JL. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat Neurosci.*, 1999

GIEDD JN, Vaituzis AC, Hamburger SD, Lange N, Rajapakse JC, Kaysen D, Vauss YC, Rapoport JL. Quantitative MRI of the temporal lobe, amygdala, and hippocampus in normal human development: ages 4–18 years. *J Comp Neurol.*, 1996

GOLDSTEIN JM, Jerram M, Abbs B, Whitfield-Gabrieli S, Makris N. Sex differences in stress response circuitry activation dependent on female hormonal cycle. *J Neurosci.*, 2010

IZQUIERDO, Iván Antonio. *Memória.* Editora Artmed, 2011 (livro)

IZQUIERDO, Iván Antonio. *Questões sobre memória.* Editora Unisinos, 2004 (livro)

J.A. MARKHAM, J.R. Morris, J.M. Juraska, Neuron number decreases in the rat ventral, but not dorsal, medial prefrontal cortex between adolescence and adulthood, *Neuroscience*, 2007

JASNOW AM, Lynch JF 3rd, Gilman TL, Riccio DC. Perspectives on fear generalization and its implications for emotional disorders. *J Neurosci Res.*, 2016

KANDEL ER, Dudai Y, Mayford MR, *The Molecular and Systems Biology of Memory.* Cell, 2014
 KESSLER RC, Aguilar-Gaxiola S, Alonso J, Chatterji S, Lee S, Ormel J, Ustun TB, Wang PS (2009). The global burden of mental disorders: an update from the WHO World Mental Health (WMH) surveys. *Epidemiol Psichiatr Soc.*, 2009

KIM JJ & Fanselow MS. Modality-specific retrograde amnesia of fear – *Science*, 1992

KOLB B, Mychasiuk R, Muhammad A, Li Y, Frost DO, Gibb R. Experience and the developing prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2012

KOSHIBU K, Levitt P, Ahrens ET. Sex-specific, postpuberty changes in mouse brain structures revealed by three-dimensional magnetic resonance microscopy. *Neuroimage*, 2004

- LAU JY, Britton JC, Nelson EE, et al. Distinct neural signatures of threat learning in adolescents and adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011
- LECHNER HA, Squire LR, Byrne JH. 100 years of consolidation--remembering Müller and Pilzecker. *Learn Mem.*, 1999
- LENROOT RK, Giedd JN. Sex differences in the adolescent brain. *Brain Cogn.*, 2010
- LEWIS EM, Barnett JF, Jr., Freshwater L, Hoberman AM, Christian MS. Sexual maturation data for Crl Sprague-Dawley rats: criteria and confounding factors. *Drug & Chemical Toxicology*. 2002
- LISSEK S, Kaczkurkin AN, Rabin S, Geraci M, Pine DS, Grillon C. Generalized anxiety disorder is associated with overgeneralization of classically conditioned fear. *Biol Psychiatry*. 2014
- LYNCH J 3rd, Cullen PK, Jasnow AM, Riccio DC. Sex Differences in the Generalization of Fear as a Function of Retention Intervals. *Learn Mem.*, 2013
- LYNCH JF 3rd, Dejanovic D, Winiecki P, Mulvany J, Ortiz S, Riccio DC, Jasnow AM. Activation of ER β modulates fear generalization through an effect on memory retrieval. *Horm Behav.*, 2014
- LYNCH JF 3rd, Vanderhoof T, Winiecki P, Latsko MS, Riccio DC, Jasnow AM. Aromatized testosterone attenuates contextual generalization of fear in male rats. *Horm Behav.*, 2016
- MAHAN AL, Ressler KJ. Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. *Trends Neurosci.*, 2012
- MARKHAM JA, Morris JR, Juraska JM. Neuron number decreases in the rat ventral, but not dorsal, medial prefrontal cortex between adolescence and adulthood. – *Neuroscience*, 2007
- McCORMICK CM, Smith C, Mathews IZ. Effects of chronic stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats. *Behav Brain Res.*, 2008
- McCUTCHEON J.E. and Marinelli M. Age matters, *Eur J Neurosci*. 2009
- McGAUGH, JL, Memory--a century of consolidation. *Science*, 2000
- McLEAN CP, Asnaani A, Litz BT, Hofmann SG. Gender differences in anxiety disorders: prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. *J Psychiatr Res.*, 2011
- NADEL L, Moscovitch M. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Current Opinion in Neurobiology*, 1997
- NADEL L, Winocur G, Ryan L, Moscovitch M. Systems consolidation and hippocampus: two views. *Debates in Neuroscience*, 2007
- NADER K, Hardt O, Miguez P. Synaptic Consolidation. *Encyclopedia of Psychopharmacology*, 2010. Disponível em: http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-540-68706-1_1147. Acesso em: outubro de 2016
- NURSE S, Lacaille J-C, Late maturation of GABAB synaptic transmission in area CA1 of the rat

hippocampus, *Neuropharmacology*, 1999

PATTWELL SS, Lee FS, Casey BJ. Fear learning and memory across adolescent development *Hormones and Behavior Special Issue: Puberty and Adolescence. Hormones and behavior*, 2013

PAUS T, Collins DL, Evans AC, Leonard G, Pike B, Zijdenbos A. Maturation of white matter in the human brain: a review of magnetic resonance studies. *Brain Res Bull.*, 2001

PIGNATELLI D, Xiao F, Gouveia AM, Ferreira JG, Vinson GP. - Adrenarche in the rat. *J Endocrinol.*, 2006

PRESTON AR, Eichenbaum H, Interplay of Hippocampus and Prefrontal Cortex in Memory, *Current Biology*, 2013

PROSSNITZ ER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol.*, 2007

PURVES-TYSON TD, Allen K, Fung S, Rothmond D, Noble PL, Handelsman DJ, Weickert CS. Adolescent testosterone influences BDNF and TrkB mRNA and neurotrophin–interneuron marker relationships in mammalian frontal cortex, *Schizophrenia Research*, 2015

QUILLFELDT, J. A. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. ed. São Paulo, SP: Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia, 2006 (livo)

SHARP P, Villano J. *The Laboratory Rat, Second Edition.* Boca Raton: CRC Press, 2012

SISK CL, Zehr JL. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Front Neuroendocrinol.*, 2005

SKUCAS VA, Duffy AM, Harte-Hargrove LC, Magagna-Poveda A, Radman T, Chakraborty G, Schroeder CE, MacLusky NJ, Scharfman HE. Testosterone depletion in adult male rats increases mossy fiber transmission, LTP, and sprouting in area CA3 of hippocampus. *J Neurosci.*, 2013

SPEAR LP, Varlinskaya EI. Low Dose Effects in Psychopharmacology: Ontogenetic Considerations. *Nonlinearity Biol Toxicol Med.* 2005

SPEAR LP. Adolescent brain development and animal models. *Ann N Y Acad Sci.*, 2004

SPEAR LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev.*, 2000

SQUIRE LR, Genzel L, Wixted JT, Morris RG. Memory Consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015

SQUIRE LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem.*, 2004

TENG E, Squire LR. Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature.* 1999

TIRELLI E, Laviola G, Adriani W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev.*, 2003

TOLIN DF, Foa EB. Sex differences in trauma and posttraumatic stress disorder: a quantitative review of 25 years of research. *Psychol Bull.* 2006

VAN EDEN CG, Kros JM, Uylings HBM. The development of the rat prefrontal cortex: Its size and development of connections with thalamus, spinal cord and other cortical areas. In: Uylings HBM, van Eden CG, De Bruin JPC, Corner MA, Feenstra MGP, editors. *Progress in brain research, The prefrontal cortex: its structure, function and pathology*, vol. 85. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 169–83 (livro)

VETTER-O'HAGEN, CS, Spear, LP. Hormonal and physical markers of puberty and their relationship to adolescent-typical novelty-directed behavior. *Developmental Psychobiology*, 2012

WANG PS, Lane M, Olfson M, Pincus HA, Wells KB, Kessler RC. Twelve-month use of mental health services in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, 2005

WILTGEN BJ, Silva AJ. Memory for context becomes less specific with time. *Learn Mem.*, 2007

WILTGEN BJ, Zhou M, Cai Y, Balaji J, Karlsson MG, Parivash SN, Li W, Silva AJ. The hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. *Curr Biol.* 2010

WINOCUR G, Moscovitch M, Sekeres M. Memory consolidation or transformation: context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nat Neurosci.*, 2007

YATES, Fancis. *The Art Of Memory*. Ed. Random House, 2011 (livro)