Lucia Machado Silva Coelho

Ansiedade e Memória:
Níveis de Alfa-CaMKII em Hipocampos de Ratos Cariocas Adultos

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Psicologia (Psicologia Clínica) do Departamento de Psicologia do Centro de Teologia e Ciências Humanas da PUC-Rio.

Orientador: Prof.Jesus Landeira-Fernandez

Rio de Janeiro
Julho de 2014

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Lucia Machado Silva Coelho

Ansiedade e Memória:
Níveis de Alfa-CaMKII em Hipocampos de Ratos Cariocas Adultos

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Psicologia (Psicologia Clínica) do Departamento de Psicologia do Centro de Teologia e Ciências Humanas da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Jesus Landeira-Fernandez
Orientador
Departamento de Psicologia – PUC-Rio

Profa. Helenice Charchat Fichman
Departamento de Psicologia – PUC-Rio

Prof. Vitor de Castro Gomes
Universidade Federal de São João Del-Rei/MG

Profa. Denise Berruezo Portinari
Coordenadora Setorial de Pós-Graduação
e Pesquisa do Centro de Teologia e
Ciências Humanas – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 29 de julho de 2014.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem a autorização da universidade, da autora e do orientador.

Lucia Machado Silva Coelho

Graduou-se em Psicologia na UNESA (Universidade Estácio de Sá) em 2006. Cursou Pós-Graduação em Acupuntura em 2008. Participou de diversos seminários e congressos na área de Neurociências.

Ficha Catalográfica

Coelho, Lucia Machado Silva

Ansiedade e memória: níveis de Alfa-CaMKII em hipocampos de ratos cariocas adultos / Lucia Machado Silva Coelho; orientador: Jesus Landeira-Fernandez. - Rio de Janeiro: PUC, Departamento de Psicologia, 2014.

76 f.: il. ; 29,7 cm.

1. Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Psicologia.

Inclui bibliografia.

1. Psicologia – Teses. 2. Ansiedade. 3. Memória. 4. Medo Condicionado. 5. α-CaMKII. 6. Western-Blotting. 7. Hipocampo. 8. Ratos Cariocas. I. Landeira-Fernandez, Jesus (Jesus Landeira-Fernandez). II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Psicologia. III.Título.

CDD:150

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Dedico esta conquista a minha mãe Ruth e aos meus filhos Rodrigo e Renata, por me apoiarem em todos os momentos desta jornada. Sem o apoio, o carinho e a compreensão deles, esta caminhada seria impossível.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a **Deus**, pela fé que eu tenho no dia de amanhã.

Ao meu orientador, **J. Landeira-Fernandez**, por me receber de braços abertos quando fui procurá-lo, demonstrando meu interesse em realizar o mestrado na PUC-Rio.

As minhas queridas co-orientadoras, **Andrea Aparecida** e **Rachel Hauser**, que ao longo desse processo se tornaram grandes companheiras.

Ao meu querido amigo **Gilson Junior** da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), que tanto me ajudou, com a sua experiência em bioquímica. Em momento atribulado do término do seu Doutorado, me recebeu, ouvindo pacientemente as minhas dúvidas e me tranquilizou, dando o suporte técnico necessário para realizar esta tarefa até o fim.

A **Prof. Claudia Vitória de Moura Gallo**, professora associada da Uerj-Departamento de genética - que cedeu gentilmente alguns reagentes necessários à minha pesquisa.

A minha querida prima **Andreia Góis**, professora da UERJ, sem a qual eu não teria acesso com tanta rapidez e facilidade às pessoas certas.

Ao querido companheiro e amigo **Vitor Gomes**.

Ao **CAPES** e a **PUC-rio**, que forneceram todas as condições para que esta pesquisa fosse realizada.

As queridas **Marcelina** e **Verinha** e a todos os funcionários e professores do Departamento de Psicologia da PUC-Rio, pela grande ajuda e apoio que recebi.

Aos queridos colegas de laboratório **Bruno Galvão**, **Erica de Lana**, **Alberto Filgueiras**, **Wassim Hassan** e **Carlos Eduardo**, que se tornaram um grande estímulo na concretização da minha meta.

As queridas **Flavia Rosseti** e posteriormente **Gabriella Vieira**, bioteristas do nosso laboratório, pelo trabalho incansável e principalmente pela amizade.

Ao professor **Fernando Cardenas**, que em suas visitas ao Brasil, sempre encontrava algum momento, para me dar uma pequena contribuição que fosse, que fez toda a diferença no desenvolvimento do meu trabalho.

A equipe, do Laboratório de química da PUC-Rio, que me cedeu inúmeras vezes, além de tempo e trabalho, reagentes e equipamentos, fundamentais à minha pesquisa.

A querida amiga **Silvia Maisonetti** e a todos os funcionários e alunos de Iniciação

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Científica do Laboratório de Neurociência e Comportamento da PUC-Rio, a atenção e o carinho que sempre me dispensaram.

As queridas alunas de Iniciação Científica **Thais Passos** e **Janaína Maia**, que estiveram sempre ao meu lado, em momentos tão importantes da minha vida, aprendendo comigo e muito mais me ensinando.

A todos os alunos da Pós-graduação do Departamento de Psicologia, que em diferentes momentos compartilharam desta caminhada comigo.

A **Dra. Sandra Sony** e toda a equipe de técnicos do Departamento de Radiologia do **Hospital Miguel Couto**, que tão bem me receberam e auxiliaram no que foi necessário, possibilitando a realização de todas as revelações necessárias ao longo desta pesquisa.

A minha querida irmã **Eliane Coelho** pelo carinho e apoio inestimável.

A minha irmã/professora **Dion**e **Coelho** pelo incentivo ao estudo, tornando-se um grande exemplo na minha vida.

A minha nora **Eliane Colepicolo** pelo apoio e ajuda.

Ao meu companheiro, **Alberto Correa e Castro Neto**, uma pessoa que conheci no final desta caminhada, e que se tornou parte indissociável da minha vida, transformando uma fase tão difícil, em um momento profundamente agradável.

Ao meu pai **Ismar Osmond Coelho** (*in memorian*).

A minha avó **Virginia Machado Silva** (*in memorian*).

E finalmente a todos os parentes e amigos, que estiveram comigo em momentos diversos e que tanto me ajudaram. O apoio de todos foi fundamental.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Resumo

Coelho, Lucia Machado Silva; Fernandez, Jesus Landeira (Orientador). **Ansiedade e memória: níveis de Alfa-CaMKII em hipocampos de ratos cariocas adultos.** Rio de Janeiro, 2014. 76 p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Muito comum nos tempos atuais, os chamados transtornos de ansiedade são as disfunções emocionais que mais afligem a qualidade de vida humana. As dificuldades de aprendizagem e os déficits de memória, são problemas recorrentes em indivíduos com estresse crônico. Evidências indicam que a Proteína Quinase dependente do Complexo Cálcio / Calmodulina (CaMKII) tem importante papel na indução do Potencial de Longa Duração (LTP) modulando a consolidação da memória em animais e humanos expostos à situação de caráter aversivo / emocional. Entretanto, pouco se sabe a respeito das diferenças de atividade desta proteína, em sujeitos com diversos níveis de emocionalidade. Estudos na área demonstram que a emoção é genéticamente influenciada. Nesta pesquisa foi utilizado o método de *Western Bloting* para analisar os níveis de α-CaMKII, nos hipocampos de ratos geneticamente selecionados para alta (Cariocas com Alto Congelamento – CAC) ou baixa (Cariocas com Baixo Congelamento - CBC) resposta condicionada de congelamento a estímulos contextuais previamente condicionados a choques elétricos. Os resultados obtidos demonstraram que o grupo CAC apresentou um nível de expressão aumentado da proteína α-CaMKII em relação aos demais grupos. Por conseguinte, as pesquisas de natureza básica que busquem compreender os mecanismos neurais, moleculares e celulares subjacentes aos transtornos ansiosos, são de fundamental importância para o desenvolvimento de terapêuticas que utilizem novas abordagens comportamentais e farmacológicas frente a esses quadros patológicos.

Palavras-chave

Ansiedade; Memória; Medo Condicionado; α-CaMKII; *Western-Blotting*; Hipocampo; Ratos Cariocas.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Abstract

Coelho, Lucia Machado Silva; Fernandez, Jesus Landeira (Advisor). **Anxiety and memory: Alfa-CaMKII levels in Hippocampus Carioca Adults Rats**. Rio de Janeiro, 2014. 76 p. MSc. Dissertation – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Very common nowadays, the so-called anxiety disorders are emotional problems that afflict the human quality of life. The learning difficulties and memory deficits, are common issues in individuals with chronic stress. Evidence indicates that the Protein kinase dependent of calcium complex calmodulin has an important role in the induction of long-term potential (LTP), modulating memory consolidation in animals and humans exposed to a situation of emotional/aversive character. However, little is known about the differences in activity of this protein, in subjects with various levels of emotionality. Studies show that emotion is genetically influenced. In this research, the method of Western Blotting was used to analyze the levels of α-CaMKII, in the hippocampus of mice genetically selected for high (Cariocas with High Freeze-CAC) or low (Cariocas with low Freezing-CBC) conditioned response of freezing to contextual stimuli, previously conditioned to electric shock. The obtained results demonstrated that the CAC group presented an increased expression level of α-CaMKII protein compared to the other groups. Therefore, the research of basic nature which seek to understand the neural mechanisms underlying molecular and cellular to anxious disorders, are of main importance for the development of therapies that use behavioral and pharmacological approaches to these pathological frames.

Keywords

Ansiety; Memory; Conditioned fear; CaMKII; *Western-Blotting*; Hippocampus, Cariocas Rats.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Sumário

1 Introdução 15
1.1. Ansiedade e Estresse 18
1.2. Memória 23
1.3. Hipocampo e Potenciação de Longo prazo (LTP) 24
1.4. Aspectos genéticos da LTP 27
1.5. Cariocas 29
1.6. Condicionamento aversivo 30

2 Proteína Quinase Dependente do Complexo Cálcio/Calmodulina II (CaMKII) 35
2.1. Actina 39

3 Objetivo 40
3.1. Objetivos específicos 40

4 Metodologia 41
4.1. Sujeitos 43
4.2. Equipamentos 43

5 Procedimentos 45
5.1. Treino comportamental 45
5.1.1 Método de Western-Blotting 47
5.1.2 Corrida SDS-PAGE unidimensional 49
5.1.3 Transferência e "imunoblotting" 50
5.1.4 Revelação dos géis 52

6 Estatística 54
7 Resultados 55
8 Discussão e Conclusões 65
9 Referências Bibliográficas 68

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática do hipocampo e seus microcircuitos. (Adaptado de: The University of British Columbia, 2006. Disponível em: http://www.psych.ubc.ca). 25

Figura 2 - Caixa de treino para Condicionamento do Medo ao Contexto. 33

Figura 3 - Caixa de contexto colocada dentro de uma caixa atenuadora de som e Programa de Computação Geo Vision. 44

Figura 4 - Esquema do paradigma de fenotipagem.Traduzido de Gomes (2012). 46

Figura 5 - Design experimental. 47

Figura 6 - Centrífuga modelo Mikro 220R Hettich, Alemanha. 48

Figura 7 - Leitor de Microplacas Spectramax Hamilton 190. 49

Figura 8 - Aparelho de Corrida de Géis de Poliacrilamida Mini-Protean Tetra Cell and PowerPac HC Power Supply-165-8027 da (Bio-Rad). 50

Figura 9 - Aparelho de Transferência de Membranas de Nitrocelulose Semi-Seco *iBlot® Dry Blotting System.* 50

Figura 10 - Foto de membrana de Nitrocelulose corada com Vermelho de Ponceau contendo proteínas após transferência. 51

Figura 11 - Membranas de Nitrocelulose em aparelho misturador Microjive para ambientação. 51

Figura 12 - Membranas de Nitrocelulose em Chassis de revelação. 52

Figura 13 - Aparelho de Revelação de Membranas de Nitrocelulose do Hospital Miguel Couto. 53

Figura 14 - Western blotting de padronização das proteínas αCaMKII (50kDa). Amostras da proteína (30µg) no hipocampo de ratos Wistar “Cariocas” e “Naives” adultos (grupos: CAC, CBC, CTR e Naive) foram submetidas à immunoblotting (anti-CaMKII). 53

Figura 15 - Média (±SEM) da porcentagem de tempo de congelamento nos quatro grupos de animais. * = diferente do grupo Naive ($p < 0,001$). 56

Figura 16 - Mostra a média (± SEM) de porcentagem de tempo em que os animais apresentaram postura de congelamento na caixa de teste. A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo. 57

Figura 17 - Revelação de proteínas. 60

Figura 18 - Imagem das revelações das bandas de proteínas para análise através do software image J. 61

Figura 19 - Exemplo de resultado em forma de gráfico segundo o Image J 61

Figura 20 - Resultados obtidos como média de α-CaMKII expressos no hipocampo (*+* EPM). 62

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Figura 21 - Resultados obtidos como média de Actina expressos no hipocampo (*±* EPM). 63

Figura 22 - Resultados mostrados como níveis médios da razão entre α-CaMKII e Actina (*±* EPM)..... 64

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Delineamento experimental. 16 animais de cada grupo separados em 2 sub-grupos, para entrada e não-entrada na caixa-teste. 46

Tabela 2 - Média, Desvio-Padrão e Erro Padrão da Média de cada um dos quatro grupos de animais. Os dados referem-se à média da porcentagem de tempo de cada minuto em que cada grupo permaneceu na postura de congelamento dentro da caixa de teste. 56

Tabela 3 - Média de α-CaMK, Actina e α-CaMKII/Actina. Os dados referem-se à média dos valores obtidos(pixels) do grupo CAC. 57

Tabela 4 - Média de α-CaMKII, Actina e α-CaMKII/Actina. Os dados referem-se à média dos valores obtidos(pixels) do grupo CBC. 58

Tabela 5 - Média de CaMK, Actina e CaMK/Actina. Os dados referem-se à média dos valores obtidos(pixels) do grupo CTR. 59

Tabela 6 - Média de α-CaMKII, Actina e α-CaMK/Actina. Os dados referem-se à média dos valores obtidos(pixels) do grupo Naive. 60

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Lista de Abreviaturas

% - Porcentagem
°C - Centígrados
µg - Micrograma
µL - Microlitro
Ac1 - Anticorpo Primário
Ac2 - Anticorpo Secundário
AMPA - Ácido α-Amino-3-Hidroxi-5-Methil-4-isoxazolepropiônico
AMPARs - Receptores de Ácido α-Amino-3-Hidroxi-5-Methil-4-isoxazolepropiônico
AMPc - Adenosina 3`,5`-Monofosfato Cíclico
ANOVA - Análise da Variância
ATP - Trifosfato de Adenosina
BSA - Albumina de Soro Bovino
CA1 - Área Corno de Amon 1
CA2 - Área Corno de Amon 2
Ca^{2+} - Cálcio
Ca^{2+}/CaM - Complexo Cálcio/Calmodulina
CA3 - Área Corno de Amon 3
CAC - Cariocas Alto Congelamento
CaM - Calmodulina
CaMKII - Proteína Quinase Dependente do Complexo Cálcio-Calmodulina II
CaMKs - CaM-quinases
CBC - Cariocas Baixo Congelamento
Cm - Centímetro
CRF - Hormônio Liberador de Corticotrofina
CS - Estímulo Condicionado
CTC - Composto de Cobre, Tartarato de Sódio e Carbonato
CTR - Controle
dB - Decibéis
DSM-IV - Manual Estatístico Diagnóstico de Saúde Mental, 4.ed.
E-LTP - Potenciação de Longo Tempo Precoce
EPM - Erro Padrão da Média
FLC - Fator Liberador de Corticotrofina
g - Grama
GD - Giro Denteado

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

GLU - Glutamato
GMP - Guanosina monofosfato
GR - Glicocorticóide
HACT - Hormônio Adrenocórticotrófico
HPA - Eixo Hipotalâmico-Pituitário- Adrenal
kDa - Kilodaltons
L-LTP - Potenciação de Longo Tempo Tardia
LCE - Labirinto em Cruz Elevado
LSD - Least-Significance Difference
LTM - Memória de longo prazo
LTP - Potenciação de longo prazo
M - Mol
mA - Miliampére
mg - miligrama
Mg^{2+} - Magnésio
$MgCl^{2+}$ - Cloreto de Magnésio
MGLUR - Receptor de Glutamato
min - Minutos
mL - Mililitro
mM - Milimol
MR - Mineralucorticóide
NaCl - Cloreto de Sódio
NaOH - Hidróxido de Sódio
nm - Nanomol
NMDA - N-Metil-D-Aspartato
NMDARs - Receptores Glutamatérgicos do tipo N-Metil-D-Aspartato
OMS - Organização Mundial da Saúde
PAG - Substância Cinzenta Periaquedutal
pH - Potencial de Hidrogênio
PKA- Proteína Quinase Dependente de AMPc
PKC - Proteína Quinase C
PN90 - Pós Natal 90
PSD - Densidade Pós-Sináptica
PTSD - Transtorno de Estresse Pós-Traumático
rpm - Rotações por Minuto
s - Segundo
SAG - Síndrome de Adaptação Geral
SBNeC - Sociedade Brasileira de Neurociência

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

SDS- Dodecil Sulfato de Sódio
SNC - Sistema Nervoso Central
T-TBS - Solução Salina Tamponada com Tris
T_{305} - Treonina 305
T_{306} - Treonina 306
TAG - Transtorno de Ansiedade Generalizada
TEPT - Transtorno de Estresse Pós-Traumático
Thr - Treonina
TRIS- 2- Amino-2-Hidroximetil-Propano-1,3-Diol
US - Estímulo Incondicionado

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

1
Introdução

Percebe-se nas sociedades ocidentais contemporâneas, um incômodo geral em relação à vida cotidiana. A necessidade de realizar muitas atividades em um curto período de tempo acarreta em muitas pessoas, sensação de atordoamento e impotência diante de tantos desafios. A quantidade de informações recebidas a cada 24 horas é enorme. A necessidade de constante atualização e a dificuldade em responder à tal demanda gera profunda angústia e ansiedade no indivíduo. A incessante busca de novas oportunidades e melhores condições de vida causa estresse. Este ciclo ininterrupto de situações tão diversas desequilibra o organismo, tanto à nivel físico quanto emocional, culminando com o colapso da saúde. Muito comum nos tempos atuais, os chamados transtornos de ansiedade são as disfunções emocionais que mais afligem a qualidade de vida humana. As pesquisas mostram que de 9% a 18% da população brasileira apresenta ou apresentará durante a vida, pelo menos um episódio relacionado com transtornos específicos de ansiedade (Almeida-Filho, 1997).

Diante de uma situação de estresse, o hipotálamo secreta o hormônio conhecido como Fator Liberador de Corticotropina (FLC) que estimula a glândula pituitária a liberar o hormônio denominado Adrenocorticotrófico (HACT), o qual age diretamente sobre o córtex adrenal, liberando glicocorticóides (GR) na corrente sanguínea. Os GR são uma classe específica de hormônios esteróides que se caracterizam pela habilidade de ligação a receptores de cortisol, desencadeando efeitos similares a estes no organismo. Um desses efeitos que ocorre muito rapidamente, é a decomposição de proteínas para posterior conversão em glicose, a qual serve para atender às necessidades corporais de energia, tão necessárias em situaçoes de altos níveis de ansiedade e estresse. Apesar de os GR serem essenciais para a manutenção da saúde, quando em excesso, esses hormônios tornam-se altamente prejudiciais, podendo ocasionar inúmeras patologias, destacando-se as úlceras gástricas, a hipertensão e inúmeras doenças cardíacas. Além disso, as dificuldades de aprendizagem e os

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

déficits de memória são problemas também recorrentes em indivíduos com estresse crônico (Selye, 1976).

O processo de estresse envolve, entre outras alterações, uma produção aumentada de adrenalina, causando diversas manifestações sistêmicas, tais como distúrbios fisiológicos e psicológicos (Selye,1976). Essas intercorrências rompem a cascata de eventos necessários ao processo normal de cognição e memória, ocasionando sérios déficits em funções importantes para a qualidade de vida do sujeito (Kloet, Joels, Holsboer, 2005). Em situações estressantes, os GR são liberados em grande quantidade na corrente sanguínea a partir do córtex adrenal, causando grande impacto sobre os neurônios hipocampais, os quais têm grande influência no processo mneumônico (McEwen, 2000). Estudos demonstram que os GR têm efeitos moduladores em diferentes fases da formação da memória (De Quervain *et al.*, 2003), a qual é um se desenvolve em diversas etapas, sendo um processo que recrutando múltiplas áreas cerebrais.

A memória divide-se basicamente em duas fases distintas: memória de curto e longo prazo. Enquanto a memória de curto prazo dura apenas alguns segundos, minutos ou horas, a memória de longo prazo pode durar a vida toda (Izquierdo, Medina, 1997). Uma outra diferença entre esses dois tipos de memória, é que a memória de curto prazo requer modificações em proteínas já existentes no neurônio, ao passo que na memória de longo prazo torna-se necessária síntese de novas proteínas durante o processo de aprendizado e memorização (Goelet *et al*, 1986). A aquisição dessas novas memórias envolve a ativação de enzimas, através de neurotransmissores. Estes se ligam a receptores, denominados de segundos mensageiros, que são responsáveis pela produção de mensagens intracelulares, as quais ativam determinadas proteínas quinases, capazes de fosforilar substratos necessários às modificações neuronais. A retenção dessas mudanças plásticas depende da duração e da manutenção, tanto das modificações covalentes na estrutura das proteínas, quanto na atividade das mesmas, as quais são responsáveis pela síntese dos segundos mensageiros. Diversos modelos de memória de longo prazo consideram a participação de proteínas no processo de aprendizagem, que a priore encontram-se constitutivamente expressas de forma inativa. A fase de aquisição da memória envolve a ativação dessas proteínas, através das modificações covalentes citadas acima. A retenção das memórias, pode ser entendida como um mecanismo auto-reforçado, o qual dura bem mais que o tempo das modificações propriamente ditas, as quais são realizadas pelas

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

proteínas. O aprendizado estimula a fosforilação de quinases, dando início ao processo denominado de autofosforilação. Quando o ganho de moléculas de fósforo (fosforilação) é maior que a perda (desfosforilação), a quinase se torna independente de estímulos externos, advindos da aprendizagem (Lisman, Zhabotinsky, 2001).

Diversos estudos demonstram que a Proteína Quinase dependente do Complexo Cálcio-Calmodulina (CaMKII) desempenha um papel importantíssimo no processo de aprendizagem e consequentemente de memorização. A CaMKII auxilia o fortalecimento das sinapses, favorecendo esse processo (Otmakhov *et al*, 2004). Ela atua também na indução da Potenciação de Longo Prazo (LTP), o qual é o mecanismo utilizado para o armazenamento de memórias em seres vivos. Estudos sobre a LTP demonstram que durante o processo de aquisição da memória, o influxo de Cálcio (Ca^{2+}) produzido pela aprendizagem faz aumentar rápida e irreversivelmente o número de receptores glutamatérgicos na membrana sináptica. Isto se deve à ativação de proteases, que degradam determinadas proteínas estruturais na célula pós-sináptica. Esta degradação, bem como a inserção de novos receptores glutamatérgicos na membrana, possibilita mudanças na atividade celular, derivadas do aumento da entrada de Ca^{2+} ocasionando o reforço necessário para a manutenção da memória. A LTP no hipocampo relacionada com a memória de longo prazo, está associada com o crescimento do contato sináptico (McEwen, 1999).

Segundo a classificação do Manual Estatístico Diagnóstico de Saúde Mental – 4ª edição – (DSM-IV) (American Psychiatric Association, 2002), embora a gama de sintomas entre os diversos tipos de transtornos psicológicos varie consideravelmente, percebe-se que a disfunção cognitiva é um elemento comum a todos eles (Martins, 2011). Os dados do levantamento epidemiológico *National Comorbidity Survey* de 1995 mostram, que somente nos Estados Unidos da América, o Transtorno de Estresse pós-Traumático (TEPT), chegou a afetar aproximadamente 10% da população feminina e 5% da masculina (Martins, 2011). O custo pago pela sociedade como um todo em consequência dos transtornos de ansiedade é extremamente elevado. Tanto a nível primário, com os atendimentos ambulatoriais oferecidos em postos de saúde à disposição da comunidade, quanto a nível secundário, em projetos de prevenção e atendimentos psicossociais, os valores são enormes (Proudfoot *et al.*, 2006). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), quase um quarto das demandas em saúde se dá em função de problemas emocionais e psicológicos.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

O resultado disso, é que a soma dos investimentos direcionados para o tratamento de doenças consequentes dos transtornos de ansiedade e do estresse causam um grande déficit nas contas governamentais em todo o mundo ocidental (Loranger, 1994).

O entendimento acerca das reações ao medo ou estresse, podem ajudar a entender um pouco mais acerca da ansiedade e do estresse. Diante de uma situação de temor, enquanto alterações neuro-endócrinas acontecem, as alterações periféricas, também induzidas pelo medo, causam grande impacto no cérebro. Apesar de as respostas imediatas ao estresse auxiliarem a sobrevivência a curto prazo, a ativação crônica dessas respostas, propiciam o desenvolvimento de vários estados emocionais patológicos (McEwen, 2003; Sapolsky *et al.*, 2000). O estresse contribui em grande medida para o aparecimento de distúrbios de ansiedade em seres humanos (Rosen, Schulkin, 1998; Maren, 2001). Por conseguinte, as pesquisas de natureza básica que busquem compreender os mecanismos neurais, moleculares e celulares subjacentes aos transtornos ansiosos, são de fundamental importância para o desenvolvimento de terapêuticas que utilizem novas abordagens comportamentais e farmacológicas frente a esses quadros patológicos. As pesquisas com animais são de enorme importância nesse sentido. (Landeira-Fernandez *et al*., 2006).

1.1. Ansiedade e Estresse

Eurípedes (485-406 a. C) deu início à uma nova visão sobre a loucura humana, incluindo neste contexto o elemento psicológico (Pessotti, 1994). Antes dele, Hipócrates (460-377 a.C.) já questionava a qualidade dos estados emocionais humanos, rompendo com o conceito reinante na época, de que os males psicofísicos seriam originados pela interiorização de aspectos demoníacos (Mayers, 1999). O termo estresse tem sido utilizado por estudiosos e público em geral em quase todas as línguas do mundo civilizado. Sinônimo de tensão, em sua raiz indo-européia, de estrangulamento na antiguidade grega e de prender, ligada à raiz do verbo “stringere” na América, esse termo nos remete a lembranças de sofrimentos e forças adversas (Guimarães, 1997). Recorre-se nesse momento ao Dicionário Aurélio (1992), em busca de um melhor entendimento acerca do processo de estresse. Segundo esta fonte, trata-se de um “conjunto de reações do organismo às agressões de ordem física, psíquica,

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

infecciosa e outras, capaz de perturbar-lhe a homeostase". Apoia-se novamente no mesmo dicionário, agora para entender o significado de homeostase. A palavra homeostase tem o significado de "estado de equilíbrio do organismo vivo, em relação às suas várias funções e à composição química de seus fluidos e tecidos". Segundo esses dados, entende-se que o estresse é o conjunto de reações que ocorre no organismo como um todo, com o intuito de favorecer o retorno ao estado de equilíbrio perdido. Esse estado, conhecido como homeostase, caracteriza-se pelo pleno funcionamento de todos os órgãos internos, concluindo-se portanto, que para o pleno funcionamento do organismo, os diversos órgãos devem funcionar em harmonia e equilíbrio entre si.

Todos os organismos vivos se esforçam no sentido de buscar um equilíbrio dinâmico, o qual é chamado de homeostase. No conceito clássico de estresse, este equilíbrio é ameaçado por eventos físicos e psicológicos que são conhecidos como estressores. Como resultado, o comportamento é dirigido para avaliar o potencial desestabilizador do estressor. Se o evento não corresponde à nenhuma representação cognitiva baseada em alguma experiência subjetiva anterior, há um aumento da excitação, estado de alerta, hipervigilância, atenção focada e processamento cognitivo. A interface entre a informação sensorial recebida e o processo de avaliação é formada na região límbica do cérebro, que por sua vez é formada por várias estruturas, incluindo o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal. Os processos que estão subjacentes à resposta ao estresse têm sido denominados coletivamente por allostase. Esse processo é adaptativo e encontra-se relacionado ao estresse nas regiões límbicas cerebrais. O mecanismo subjacente a este processo, envolve uma resposta integrada, que começa com a rápida indução de hormônios e alterações na conformação dos receptores cerebrais. Estas alterações estão relacionadas à transcrição de genes (Kloet, Joels, Holsboer, 2005).

De acordo com a teoria da evolução (Darwin, 1859/2000), a ansiedade ou estresse é produto de um sistema motivacional de defesa, responsável pela organização de respostas específicas com o objetivo de lidar de forma adequada às ameaças do meio externo. A partir dessa perspectiva, vários estudos têm definido a ansiedade – inclusive a ansiedade patológica – como componente essencial de um sistema neural que teve origem com os mamíferos e desde então vem se mantendo ao longo da evolução das espécies. Esse sistema é responsável pela detecção de estímulos de perigo no meio ambiente, bem como por reagir de forma adequada a esses estímulos que ameaçam a integridade do

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

organismo (Miller, Weiss, 1969; Blanchard, Blanchard, 1988; Fanselow, Lester, 1988; Graeff, 1994; Rosen, Schulkin, 1998).

Somente na década de 1920, Walter Cannon confirmou a suposição de que a reação ao estresse faz parte de um sistema unificado mente-corpo. Cannon demonstrou que o frio muito intenso, a falta de oxigênio e os incidentes emocionais desencadeam um fluxo de adrenalina e noradrenalina no corpo do sujeito. Esses hormônios, conhecidos atualmente como Hormônios do Estresse, entram na corrente sanguínea, quando o organismo é alertado por diversas sequências de reações do cérebro. Como resposta a este alerta, o sistema nervoso simpático entra em ação. Os batimentos cardíacos aumentam e a respiração acelera. A gordura das reservas internas é liberada. O corpo está pronto para lutar ou fugir. A reação ao estresse chamou a atenção de Cannon. Percebendo que esta resposta é uma adaptação do organismo para lidar de forma adequada às condições ambientais, concluiu que o mesmo é inteligente e econômico, buscando a adaptação às mudanças que ocorrem, tanto internas quanto externas. Foi Cannon, quem primeiro utilizou o termo conhecido como resposta de luta ou fuga, que passou a ser utilizado para descrever a preparação fisiológica dos animais para lidar com algum tipo de ataque. Esta preparação do organismo inclui batimentos cardíacos aumentados, contração do baço, redistribuição do suprimento sanguíneo da pele e das vísceras tanto para os músculos quanto para o cérebro, aprofundamento da respiração, dilatação das pupilas, inibição das secreções gástricas e aumento da liberação de glicose do fígado. O organismo então está pronto para se defender (Gazzaniga, 2005).

As descobertas de Cannon na década de vinte do século passado, foram a base para as pesquisas de Hans Selye, 20 anos mais tarde. Selye percebeu, que em reação à diferentes estressores, um padrão de três respostas seria identificado no organismo. Esse conjunto de sintomas, denominado de Síndrome de Adaptação Geral (SAG) é deflagrado quando um indivíduo confronta-se com algumas situações de estresse. As glândulas supra-renais incham, as estruturas linfáticas atrofiam e úlceras estomacais podem surgir. Selye demonstrou que essas três respostas seriam a marca registrada de uma resposta de estresse não-específica, demonstrando a incapacidade do organismo de resistir à estressores adicionais. Este transtorno se caracteriza por um padrão de respostas ao estresse, consistindo em três estágios distintos: alarme, resistência e exaustão (Mayers, 1999).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

O conceito de estresse, originalmente surgiu na física, designando tensão e desgaste à que estão submetidos os materiais. Selye foi o primeiro estudioso a utilizar esse termo em seu sentido moderno no campo das neurociências (Martins, 2011). No conceito clássico de estresse, o equilíbrio do organismo é alterado por algum evento fisico ou psicológico, conhecido como estressor (Kloet, Joels, Holsboer, 2005). A palavra “estressor” pode ser definida como um evento ou estímulo ambiental, que ameaçando o organismo leva-o a uma resposta de enfrentamento ou *coping*. O corpo responde à situação de estresse apresentando sintomas variados. Essas reações, são respostas fisiológicas que acompanham o estresse e prepara a pessoa para lutar ou fugir do perigo. Esta reação rápida e automática tem como objetivo a facilitação e possibilidade de sobrevivência e reprodução (Gazzaniga, 2005).

Os estressores podem variar em sua origem e estão divididos em quatro grupos. No primeiro grupo, encontram-se os estressores ligados aos eventos biográficos. No segundo, encontram-se àqueles relacionados aos traumas, cuja intensidade extrapola o habitual. No terceiro, encontram-se os estressores de ordem cotidiana e no quarto e último grupo, enquadram-se os estressores crônicos. Em relação às classes de estímulos que podem ativar o sistema motivacional de defesa, existem dois tipos distintos. O primeiro tipo, engloba os estímulos naturalmente ameaçadores. Esses estímulos são reconhecidos de maneira inata por todos os indivíduos de uma determinada espécie, devido ao processo de evolução. O segundo tipo, se refere aos estímulos condicionados, adquiridos através de processos de aprendizagem. Contudo, existem estímulos inicialmente neutros, que adquirem a capacidade de eliciar reações de defesa através de aprendizagem associativa. O medo deflagrado pelo trauma ambiental, dentro dos conceitos cognitivos e comportamentais é o resultado do pareamento entre um estímulo inicialmente neutro e uma reação inata do organismo, sendo portanto um fenômeno aprendido. O condicionamento clássico Pavloviano é a base para a geração desse medo. As pesquisas demonstram que o aprendizado associativo permite que um estímulo sensorial (som, imagem, odor ou textura) possa ser associado à uma reação comportamental de desespero, impotência e medo. Após o pareamento, uma reação comportamental mal adaptativa frente ao estressor, provoca a redução da capacidade de enfrentamento de novas situações ameaçadoras com consequente manutenção deste transtorno (Fioravanti *et al.*, 1996).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

A situação de estresse ativa o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA). O hipotálamo secreta o hormônio denominado Fator Liberador de Corticotropina (FLC), que estimula a glândula pituitária a liberar o HACT. Quando liberado na corrente sanguínea, o HACT age sobre o córtex adrenal, liberando glicocorticóides, que são hormônios esteróides das glândulas adrenais, que produzem a maioria dos efeitos corporais do estresse, auxiliando a síntese protéica para futura conversão em glicose. Este processo atende às necessidades imediatas do corpo, que precisa de energia rapidamente em situações estressantes. A ação prolongada dos glicocorticóides, no caso do estresse crônico tem um impacto muito negativo sobre a saúde. Embora sejam essenciais para a saúde normal, a longo prazo os glicocorticóides estão associados à hipertensão, à doença cardíaca, à diabete, e à diminuição do interesse sexual. Além disso, os glicocorticóides têm um importante papel na regulação do comportamento ansioso (Bremner *et al.*, 2006). Devido a sua estrutura lipofílica eles podem cruzar facilmente a barreira hematoencefálica. Assim sendo, entram facilmente no encéfalo influenciando várias respostas e agindo diretamente na emoção e na cognição (Sandi *et al.,* 2003). Por atuarem principalmente nos receptores mineralucorticóides (MR) e GR, o hipocampo é o principal alvo de atividade dos GR, pois essa estrutura cerebral possui uma grande quantidade de MRs e GRs (Kloet, Joels, Holsboer, 2005). Assim, explica-se o fato de o estresse crônico levar também a déficits de memória, que são um dos reflexos da ação dos GR sobre os neurônios hipocampais. O hipocampo é uma das principais áreas relacionadas aos processos mneumônicos. Sendo assim, qualquer dano ou lesão nessa região cerebral ocasiona alterações importantes na memória (Selye, 1976).

Os estudos com ratos têm demonstrado que o Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG) provoca o aumento das concentrações de GR (corticosterona no rato) plasmáticas (Adams *et al.*, 2003). Os pesquisadores observaram que os pacientes com transtorno de ansiedade têm o eixo HPA hiperativado, aumentando com isso a liberação do Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRF) pelo hipotálamo. Isso faz com que a glândula pituitária anterior secrete ACTH, hormônio que em níveis elevados estimula o aumento da biossíntese e a liberação de cortisol (principal hormônio GR endógeno em humanos). Logo, esses resultados sugerem alguma correlação entre animais e seres humanos, demonstrando existir uma associação entre a alta taxa de concentração de GR no sangue e a resposta ao estresse (Buchanan *et al.*,

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

2004). Sabe-se que a ansiedade diante de situações adversas é um fenômeno tipicamente humano, contudo as pesquisas demonstram haver uma uma correlação entre certos tipos de ansiedade e alguns comportamentos de defesa expressos por animais diante de certos estímulos ou situações de perigo (Galvão, 2012). O comportamento de congelamento ou *freezing* é uma das principais respostas condicionadas de um animal frente a estímulos ameaçadores.

Trabalhos empregando ratos geneticamente selecionados para alto ou baixo nível de emocionalidade representam uma importante ferramenta na investigação da relação existente entre os diferentes aspectos que envolvem os transtornos de ansiedade (Gomes, Landeira-Fernandez, 2008). Evidências consideráveis indicam a importância do condicionamento de medo ao contexto no entendimento do comportamento ansiogênico em animais. Neste paradigma específico, a resposta de congelamento a estímulos contextuais previamente associados a choque nas patas é um dos modelos animais mais confiáveis para ansiedade antecipatória (Brandão *et al.*, 2008).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

1.2. Memória

A memória pode ser definida como o processo de aquisição, formação, conservação e evocação de informações (Izquierdo, Medina, 1997). A aquisição dessas informações acerca do meio ambiente, se faz através de mecanismos de sensação e percepção. Este primeiro período pode ser entendido como o espaço de tempo onde as informações são ainda somente estímulos sensoriais. Nessa fase, o indivíduo observa, registra e/ou reage (Goelet *et al*, 1986). O período posterior, conhecido como consolidação, conservação ou armazenamento, se faz através dos processos de memorização. Neste período, o traço de memória ainda é instável e pode ser modulado por várias informações acerca do estado interno do indivíduo (McGaugh, 2002).

De acordo com o conteúdo que armazena, pode-se divididir a memória em duas grandes categorias: memória explícita ou declarativa e memória implícita ou não declarativa. A memória explícita é responsável pelo armazenamento de conteúdos que a pessoa pode trazer à mente ou declarar. São informações como rostos, eventos e dados biográficos. Possui como substrato fisiológico as estruturas do lobo temporal, destacando-se o hipocampo (Squire, Zola, 1996). A memória implícita armazena as informações operacionais que são adquiridas na

maioria das vezes de forma inconsciente. Requer, principalmente, a atuação do cerebelo, da amígdala, do neocórtex e do estriado (Squire, 1992).

A memória é dividida também de acordo com o tempo que a informação pode ser retida. Sendo assim, ela pode ser denominada de memória imediata ou de trabalho, que é a manutenção de uma informação por intervalos de tempo muito curtos, que vão de poucos segundos até alguns minutos (Broadbent *et al*, 2004). Pode ser denominada também de memória de curta duração, quando as informações se mantém por apenas algumas horas. Além desses dois tipos de memória temos também a memória de longa duração, que pode reter informações durante alguns meses, anos ou mesmo por uma vida inteira (Cohen, Squire, 1980). Tanto a memória de curta quanto de longa duração são processadas pela região hipocampal e estruturas associadas do lobo temporal (Broadbent *et al.*, 2004).

1.3. Hipocampo e Potenciação de Longo prazo (LTP)

O que se denomina como formação hipocampal abrange a região conhecida como Corno de Amon, a qual se subdivide em CA1, CA2 e CA3. Compreende também o Giro Denteado (GD), o Subiculum, Pré-Subiculum, Parasubiculum e o Córtex Entorrinal. Existem algumas controvérsias em relação à posição da região CA2. Diversos autores, a consideram uma região de transição, a qual estaria separada das demais, visto que compreende uma área estreita, interposta entre CA1 e CA3. O fluxo de informações que chega ao hipocampo percorre esta região no seguinte sentido: aferências sensórias chegam ao córtex entorrinal, que emite projeções para o GD, o qual envia a informação para CA3, passando por CA2 e finalmente alcançando CA1. Esta, por sua vez, reenvia as projeções para o córtex entorrinal que desempenha neste momento a função de saída, enviando projeções de informações já processadas para outras regiões tais como o córtex pré-frontal, a amígdala e o hipotálamo (Bear *et al.*, 1990).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

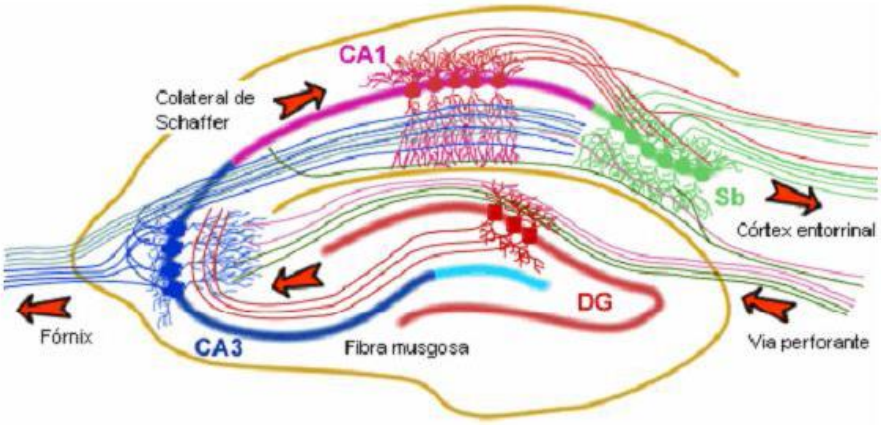

Figura 1 - Representação esquemática do hipocampo e seus microcircuitos. (Adaptado de: The University of British Columbia, 2006. Disponível em: http://www.psych.ubc.ca).

Diversas funções já foram atribuídas ao hipocampo, sendo que algumas se destacam, como o processamento de memória episódica de curto e médio, mas não de longo prazo, separação, associação e retomada de padrões associados a informações espaciais e temporais e processos de epileptogênese (Silva, Cavalheiro, 2004). As sub-regiões hipocampais (GD, CA1 e CA3), apesar de atuarem de modo cooperante em muitos casos, desempenham funções distintas no processamento de diferentes tipos de memórias. O GD é responsável pela criação de uma representação espacial métrica a partir das informações sensórias obtidas e atua no processo de separação de padrões espaciais em conjunto com CA3. A sub-região CA3 por sua vez, desempenha funções como associação de padrões espaciais, detecção de novidades e processamento de memória de curto prazo. Enquanto isso, a sub-região CA1 participa da associação de padrões temporais, assim como do processamento de memória de médio prazo, sendo uma sub-região chave para a ocorrência de processos de consolidação da memória (Lengyel *et al.*, 2004)

O mecanismo utilizado para o armazenamento de memórias em seres vivos ainda não é totalmente conhecido. Contudo, estudos indicam a Potenciação de Longo Prazo (LTP) como o principal mecanismo para tal ocorrência (Rosler, Quevedo, 1998). A LTP foi descoberta pela primeira vez no hipocampo, definindo-se como um aumento duradouro na resposta excitatória pós-sináptica (Bliss, Lomo, 1973), que dá suporte ao processo de plasticidade no cérebro (Malenka, 1994; Maren, Baudry, 1995; Martin *et al*, 2000). A LTP depende da ativação, principalmente de quatro enzimas capazes de se tornarem ativas através de estímulos breves. Algumas moléculas apresentam grande sensibilidade para os padrões de variação na concentração intracelular de Ca^{2+}.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

A ocorrência da LTP pode ser explicada em função dessa dependência de enzimas capazes de se tornarem ativas mesmo quando os sinais são muito breves (Lisman, 1989). O Ca^{2+} é o estímulo intracelular que dá início ao processo da LTP. Contudo, sendo o aumento de sua concentração muito breve, ocasiona a ativação preferencial de moléculas com alta afinidade e altas taxas de associação a esse íon (Antunes, 2007).

Acredita-se que a LTP seja fundamental para o processo de aprendizagem e memória, sendo o modelo celular predominante para codificação de memórias no cérebro (Kimura *et al*, 2008). Várias propriedades da LTP, como a rápida indução e grande capacidade de associação, colaboram para que ela seja apontada como responsável pela codificação das memórias de medo condicionado (Maren, 1999, Rogan, LeDoux 1996). Quanto ao armazenamento da memória, é possível distinguir uma sub-divisão na própria LTP, sendo observado duas fases distintas nesse processo. A primeira fase, denominada de LTP precoce ou inicial (E-LTP), de curto prazo, dura somente alguns minutos e se mostra independente de síntese proteica. A segunda fase, um pouco mais tardia, denominada de L-LTP, dura muito mais tempo e exige síntese de proteínas, assim como a memória de longo prazo (LTM) (Barco *et al.*, 2008). A LTP inicial hipocampal é um processo que apresenta três características fundamentais em suas vias bioquímicas: elas amplificam o sinal de entrada, se coordenam e se integram (Dineley *et al.*, 2001). São essas características, aliadas às propriedades intrínsecas de algumas moléculas, que possibilitam grande parte da ativação persistente de enzimas específicas (Antunes, 2007).

A LTP é um fenômeno persistente que segue as três propriedades propostas por Hebb (1949/1968) para o aprimoramento da eficiência na comunicação sináptica, processo também denominado de aumento do peso sináptico (Martin *et al.*, 2000). A LTP apresenta cooperatividade entre fibras aferentes ativadas, significando que um estímulo fraco, ocorrendo simultâneamente à um estímulo forte, é intensificado. A LTP possui também associatividade, ou seja, é necessária sincronia na ativação de certo número de fibras para que ocorra o aumento no peso sináptico. Além disso, a LTP requer especificidade de entrada, ou seja, somente as fibras que participam diretamente da sinapse apresentam o aprimoramento em sua comunicação (Antunes, 2007). Por possuir essas tres características, a LTP é considerada a principal alteração plástica hebbiana, o que a torna um importante processo vinculado com a ocorrência de fenômenos cognitivos persistentes, destacando-se a memória (Bi,

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Poo, 2001). A LTP também tem sido associada com a memória em função de sua ocorrência marcante em uma área específica do cérebro: o hipocampo (Maren, 1999).

Scoville e Milner (1957), foram os primeiros autores a vincular o hipocampo com a memória. Em seus trabalhos são relatados prejuízos de memória em pacientes com lesão hipocampal e em estruturas do lobo temporal. O caso de H. M., considerado a primeira evidência do requerimento hipocampal para a formação de memórias estabeleceu alguns pontos centrais do papel do hipocampo na memória. Um ponto importante se refere à existência da dissociação entre a memória e as outras funções intelectuais (Mishkin, 1978). Além disso, os efeitos da lesão hipocampal são seletivos a determinadas formas de memória (Milner *et al.*, 1998), explicada pelo fato da memória possuir diversas fases e serem processadas por distintas áreas cerebrais (Squire, 1992).

1.4. Aspectos genéticos da LTP

Dentre os diferentes indivíduos de uma mesma população, pode-se encontrar muitos graus de diferença tanto a nível comportamental quanto fisiológico. Essas diferenças têm relacão com a capacidade que cada um tem de enfrentar situações de estresse e vulnerabilidade (Garcia *et al.*, 2012). Várias pesquisas na área vêm demonstrando que a emoção é genéticamente influenciada. Estudos com diferentes espécies animais, como camundongos (Calderone *et al.*, 1997), ratos (Landgraf, Wigger, 2002) e também com humanos (Grillon *et al.*, 1998), apontam que cada espécie tem uma reação diferente frente à estressores externos e que as mesmas têm caráter hereditário.

A fenotipagem é o nome que se dá ao procedimento utilizado para se obter linhagens selcionadas para um determinado traço. Com o objetivo de entender um pouco mais acerca das influências genéticas que possam influenciar o comportamento defensivo de animais, utiliza-se esse procedimento de seleção de linhagens através de sucessivos cruzamentos de uma dada população que apresente altos ou baixos valores extremos do traço desejado. As Cepas, são geradas através do cruzamento consanguíneo (irmãos e irmãs) de uma população específica, que possuam algum traço semelhante, por diversas gerações seguidas. Após aproximadamente vinte gerações, os indivíduos de uma cepa já se tornaram isogênicos (geneticamente idênticos entre si). A seleção bi-direcional é uma seleção genética baseada nos extremos do fenótipo

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

desejado. Conforme o tempo vai passando, as duas linhagens divergentes mostram através das gerações, diferenças cada vez maiores em relação ao traço desejado e como consequência, nos genes que definem tal traço. Entretanto, no que se refere aos outros traços característicos desta população, as duas linhagens permanecem similares (Grahame, 2000). A seleção de animais com base no desempenho em um determinado teste, resulta em linhagens com consistentes padrões comportamentais através das gerações. Este processo de seleção é capaz de influenciar o padrão de respostas fisiológicas subjacentes ao traço selecionado (Steimer, Driscoll, 2005).

Diferentes modelos animais são utilizados na investigação dos processos que se relacionam com a emoção. O comportamento natural do rato de explorar o ambiente à sua volta, bem como de reagir a ambientes novos ou potencialmente aversivos, cria inúmeras possibilidades de estudos e observação das diversas ações dos roedores. O modelo de Campo Aberto possibilita observar a locomoção, urinação, defecação, congelamento, pulos, corridas e tempo despendido em cada setor da arena. Além disso, permite também a testagem de fármacos. O Teste da Caixa de Transição Claro e Escuro, é um dos modelos mais utilizados para a testagem da ansiedade em camundongos. O Labirinto em Cruz Elevado, além de possibilitar a testagem de diferentes agentes farmacológicos, possibilita a utilização de variáveis etológicas na descrição dos comportamentos de roedores. O Teste de Interação Social e os Testes de Conflito, utilizam choques para supressão de respostas condicionadas, constando também do repertório de testes comportamentais utilizados para a seleção de traços fenotípicos (Mormède *et al.*, 1998).

Os ratos romanos (Roman High e Low), foram inicialmente selecionados a partir de uma cepa Wistar, além de servirem como base para a formação de outras sub-linhagens (Giorgi *et al.*, 2007). A Resposta de Esquiva Ativa foi utilizada como critério em uma Caixa de Vai-e-Vem (Bignami *et al.*, 1965). Um outro par de linhagens importantes, foram as linhagens Maudsley Reativos e Não-reativos. Foi desenvolvida por Broadhurst, em 1954. Elas tornaram-se clássicas em diversos estudos genéticos, caracterizando-se pela reatividade de ratos no Campo Aberto. Os animais da linhagem de baixa reatividade apresentam uma defecação próxima de zero, enquanto que a linhagem divergente, mais reativa, possui uma taxa de defecação maior. A locomoção também se mostrou divergente entre os dois grupos (Mormède *et al.*, 1998).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Na Universidade de Leipzig, nos anos de 1980, foram desenvolvidas duas linhagens de animais com extremos no comportamento defensivo chamadas de HAB (High Anxiety Related Behavior) e LAB (Low Anxiety Related Behavior). Estas linhagens se mostraram divergentes no labirinto em cruz elevado, no teste do campo aberto e no teste do nado forçado (Landgraf, Wigger, 2002). Além disso, Ramos e colaboradores, em 2003, desenvolveram duas linhagens de ratos que se caracterizam pelos divergentes níveis de comportamentos defensivos no campo aberto, no labirinto em cruz elevado e na caixa de transição claro e escuro (Ramos *et al.*, 2003).

1.5. Cariocas

O estresse pode ser melhor estudado através do que ficou conhecido como seleção fenotípica. A fenotipagem é atualmente a ferramenta ideal para se estudar populações vulneráveis ao estresse. Tais populações se mostram naturalmente capazes de melhor ilustrar os substratos neurais dos transtornos de ansiedade. O trabalho que vem sendo realizado no Laboratório de Neurociência da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio), com ratos a partir da linhagem Wistar, por isolamento fenotípico de resposta condicionada de medo ao contexto, são denominadas de Cariocas de Alto Congelamento (CAC) e Cariocas de Baixo Congelamento (CBC). Também utilizam uma linhagem Wistar controle (CTR), criada, fenotipada e submetida aos mesmos procedimentos das outras linhagens, porém sendo submetidas a cruzamento randômico (Gomes, Landeira-Fernandez, 2008).

Segundo Anhuaman (2012), um dos procedimentos experimentais mais amplamente utilizado para o estudo da ansiedade e da memória emocional na atualidade, parece ser o teste do medo condicionado ao contexto. Neste procedimento específico, um estímulo a princípio neutro ⁄ condicionado (CS) é apresentado ao mesmo tempo que um estímulo aversivo incondicionado (US), como um choque, por exemplo. Dependendo do protocolo experimental escolhido, depois de alguns pareamentos repetidos o CS começa a produzir respostas emocionais condicionadas na presença única do CS, como a supressão de respostas operantes, comportamento de freezing (Gomes, Landeira- Fernandez, 2008), mudanças na atividade autonômica (Resstel *et al.*, 2008) e facilitação da ação reflexa (Phillips, Ledoux,1994). Este modelo tem sido utilizado na avaliação de efeitos de drogas utilizadas para o tratamento do

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG) e Transtorno de Estresse Pós-traumático (PSTD). A circuitaria neuroanatômica associada com o medo condicionado ao contexto inclui como estruturas principais o hipocampo, a amígdala e suas conexões com a Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) (Fanselow, Dong, 2010). Depois das tres primeiras gerações, os ratos Cariocas de Alto Congelamento (CAC) apresentaram uma alta propensão a apresentar a resposta condicionada ao contexto de *freezing* quando comparados com os Cariocas de Baixo Congelamento (CBC) e os Controles (CTR). Além disso, a linhagem de ratos CAC tem sido testada em modelos que avaliam aspectos cognitivos e emocionais. No que se refere a modelos animais de ansiedade, a linhagem CAC foi testada no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e no teste de interação social, tendo sido observado um elevado índice de ansiedade nesses animais, em relação aos ratos CTR, sem evidências de alterações locomotoras. Em modelos que avaliam depressão e memória, os animais CAC não mostraram diferenças significativas comportamentais com a linhagem CTR no teste do nado forçado e no teste de reconhecimento de objetos (Dias *et al.*, 2009).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

1.6. Condicionamento aversivo

Atualmente, as pessoas não precisam mais se defender de predadores, como em épocas passadas. Contudo, a emoção de medo e os comportamentos defensivos relacionados ao mesmo, ainda são muito frequentes e continuam sendo importantes para a sobrevivência. O medo auxilia nas reações rápidas necessárias em situações comuns do dia a dia. No momento de pisar no freio do carro ou em situações perigosas que gritamos por socorro pedindo ajuda, somos impulsionados pelo medo (Rodrigues *et al.*, 2009). Contudo, a ativação crônica dessas respostas, propiciam o desenvolvimento de vários estados emocionais patológicos. Acredita-se que inúmeras doenças físicas, como também emocionais, como a hipertensão arterial e a resistência do organismo à insulina, acabam surgindo, ocasionadas pelo estresse crônico. A baixa imunidade que favorece as infecções, isquemias e diabetes, as fobias, a depressão e a ansiedade, além do TEPT são distúrbios muito frequentes que aparecem nos dias atuais, ocasionadas pelo estresse constante (McEwen, 2003; Sapolsky *et al.,* 2000).

A evolução dotou muitas espécies com defesas naturais. Esta característica é importante no sentido de que auxilia-as a se protegerem de

possíveis predadores. Dessa forma, o organismo é capaz de lidar rápida e efetivamente com as adversidades provenientes do meio ambiente. Alguns animais conseguem escapar de determinada situação de perigo, devido à sua capacidade inata de esguichar substâncias de odor forte e desagradável em seu oponente. Enquanto isso, outras espécies inflam seus corpos ao se sentirem ameaçadas, fazendo com que pareçam bem maior do que realmente são, afugentando seus oponentes (Rodrigues *et al.*, 2009). O termo conhecido como medo, se refere a dois fatores: Primeiramente, ao conjunto de respostas corporais que acompanham a sensação de perigo. Em segundo lugar, faz referência ao estado psicológico que a ameaça ocasiona (LeDoux, 1998). As pesquisas nesta área propiciam o entendimento cada vez mais profundo de como a emoção de medo se organiza no cérebro (Rodrigues *et al.*, 2009). Nos estudos sobre o comportamento de medo, o condicionamento clássico, também conhecido como condicionamento Pavloviano, se apresenta como um modelo bastante favorável a esse tipo de pesquisa (Fanselow, Poulos, 2005; LeDoux, 2007; Maren, 2001, 2005; Paré *et al.*, 2004). O sistema psicofisiológico do medo é entendido como um conjunto de circuitos que detectam e respondem ao perigo.

São diversos os meios para se acessar o aprendizado do medo. Uma dessas formas é avaliando e quantificando as respostas condicionadas (Rodrigues *et al.*, 2009). Um estímulo neutro [estímulo condicionado(CS)] pode adquirir propriedades afetivas quando emparelhado com um determinado evento biologicamente significativo [estímulo incondicionado (US)]. Como a relação CS-US é aprendida, respostas fisiológicas e comportamentais inatas, são eliciadas sob o controle do CS. Por exemplo, se um rato recebe um estímulo sonoro (CS) seguido de um choque eléctrico (US), após alguns emparelhamentos som e choque (frequentemente uma vez é suficiente), respostas defensivas que ocorrem tipicamente na presença de perigo, serão provocadas pelo som. Exemplos típicos de respostas espécie-defensivas eliciadas sob o controle de CS incluem comportamentos defensivos, tais como o congelamento e as respostas autonômicas e endócrinas, causadas pela liberação de hormônios específicos. Esta forma de condicionamento tem sido observada em trabalhos realizados com diferentes espécies, tais como peixes, pinguins, coelhos, ratos, cachorros, macacos e humanos (LeDoux, 2000). O comportamento de medo condicionado ou condicionamento Pavloviano se torna muito útil para avaliar o envolvimento dos diversos sistemas envolvidos no comportamento emocional.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Estes estudos ajudam a entender que as alterações neuro - endócrinas e periféricas que acontecem no organismo, induzidas pelo medo causam severo impacto no cérebro (McEwen, 2003; Sapolsky *et al.*, 2000).

A exposição a eventos estressores promove prejuízo na neurotransmissão serotoninérgica hipocampal e aumento na liberação de glutamato, promovendo alterações em fatores associados à plasticidade neuronal (McEwen, 2005). Demonstrou-se que o estresse crônico inibe a neurogênese adulta bem como a proliferação celular no hipocampo (Oomen *et al.*, 2007). A neurogênese hipocampal está associada ao aprendizado de novas tarefas e processamento de tarefas cognitivas. Situações de estresse poderiam, desta forma, prejudicar estes processos, assim como a aquisição e consolidação de respostas adaptativas que facilitariam o desempenho frente à estressores subsequentes (McEwen, 2005). Demonstrou-se ainda, que o estresse contribui em grande medida para o aparecimento de distúrbios de ansiedade em seres humanos (Rosen, Schulkin, 1998; Maren, 2001).

Nos últimos anos, observa-se um grande aumento nas pesquisas acerca do condicionamento do medo, muito provavelmente, por ser um modelo que mostra uma grande relação tanto com a memória quanto com a emoção (LeDoux, 2000; Maren, 2001). O medo condicionado é uma forma persistente e muito rápida de aquisição de aprendizado por associação simples (Fanselow, Lester, 1988). Quando um rato é colocado em uma caixa de treino pela primeira vez, e lhe é apresentado um leve choque nas patas, inicialmente ele tem uma explosão de atividade. Somente depois ele apresenta um comportamento de congelamento, ou seja, ele fica totalmente imóvel por instantes. Essa é uma reação natural de defesa. O comportamento de congelamento é entendido, como uma reação de defesa espécie-específica. Esta imobilidade mostra-se importante no ambiente natural, onde o predador tem maior probabilidade de atacar a presa em movimento, do que quando esta encontra-se parada (Bolles, Collier, 1976).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Figura 2 - Caixa de treino para Condicionamento do Medo ao Contexto.

Após 24 ou 48h, o animal, ao ser reexposto na mesma caixa, apresenta o comportamento de congelamento, mesmo sem a presença do choque (Fanselow, Poulus, 2005). Este fenômeno, diferentemente do congelamento do dia anterior, é uma resposta condicionada. O congelamento ou *freezing* é caracterizado por uma postura tensa e encolhida (Blanchard, Blanchard, 1971), sendo uma reação específica do medo condicionado. A resposta condicionada é causada pela associação entre as pistas contextuais da caixa de treino e o choque. É uma forma potente de aprendizado, onde o medo condicionado acarreta mudanças importantes e permanentes no sistema nervoso central (Fanselow, Lester, 1988). As teorias de aprendizado por associação dão enfase a convergência entre o estímulo condicionado (CS) e o estímulo incondicionado (US) em um tipo particular de células. Esta associação gera o fortalecimento das sinapses. A entrada de sinais emitidos através da resposta condicionada é direcionada para as células ativadas. A plasticidade sináptica é o mecanismo que subjaz a formação associativa (Collingridge *et al*., 1983). A memorização do aprendizado depende da estabilidade dessas mudanças.

A LTP, induzida pela ativação de Receptores Glutamatérgicos do tipo N-methyl-D-aspartato (NMDARs) no medo condicionado, é o tipo de plasticidade sináptica mais fortemente enfatizada no processo de aprendizagem. É uma forma excitatória de transmissão sináptica, com importante papel no mecanismo da memória de medo. A LTP é rapidamente adquirida, fortalecendo e aprimorando as sinapses que acompanham as estimulações de alta frequência

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

nas vias de sinalização neural, determinantes para o aprendizado e a memória (Bliss, Lomo, 1973; Lynch, Baudry 1990). Fisiologicamente, o glutamato se liga aos receptores de AMPA, despolarizando a célula pós-sináptica. Essa despolarização permite a ligação a NMDARs, possibilitando a entrada de íons Ca^{2+} na célula pós-sináptica através dos canais de NMDA, desencadeando uma série de mecanismos intracelulares, que resultam na indução de genes e síntese de novas proteínas (Kandel, Squire, 2003). Os NMDARs têm um importante papel no desenvolvimento da LTP (Collingridge, 1985). Antagonistas de NMDA têm sido utilizados como bloqueadores de indução de LTP em vários estudos (Collingridge *et al.*, 1983). Os NMDARs e não-NMDA representam papéis diferentes na LTP. Os primeiros induzem LTP, enquanto que os últimos potencializam a expressão de LTP, sem influência na indução (Fanselow, 1991).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

2
Proteína Quinase Dependente do Complexo Cálcio/Calmodulina II (CaMKII)

As proteínas são as moléculas trabalhadoras das células e executam o programa de atividades codificado pelos genes (Lodish *et al.*, 2002). São especialmente abundantes e versáteis, possuindo milhares de funções diferenciadas nas células. Uma molécula de proteína é formada a partir de uma longa cadeia de aminoácidos, cada um ligado ao seu vizinho por uma ligação peptídica covalente. Por esta característica, as proteínas também são conhecidas como polipeptídeos. Os aminoácidos são muito importantes para as células, devido ao papel que desempenham na construção das proteínas. Eles formam uma classe variada de moléculas, tornando-se as subunidades das proteínas. A versatilidade química que os 20 aminoácidos-padrão possibilitam, é de fundamental importância para a função proteica (Alberts *et al.*, 2002).

A estrutura das proteínas é descrita em termos de quatro níveis hierárquicos de organização: a estrutura primária, que é a sequência dos resíduos de aminoácidos que formam a cadeia linear; a estrutura secundária, à qual refere-se à organização localizada de partes de uma cadeia de polipeptídeos, podendo apresentar inúmeras disposições espaciais diferentes; a estrutura terciária, que se refere à conformação total de uma cadeia de polipeptídeos e por último, e mais alto nível na estrutura de uma proteína, encontra-se a estrutura quaternária, que descreve o número e as posições relativas das várias subunidades contidas numa proteína multimérica (Lodish *et al.*, 2002). Muitas proteínas funcionam como enzimas, que são catalizadores que formam e rompem as ligações covalentes necessárias à célula. Outras, são utilizadas como componentes estruturais, se autoagrupando para formar os microtúbulos e ainda outras, que atuam como motores moleculares, produzindo força e movimento nos músculos. As proteínas constituem a maior parte da massa celular seca e executam praticamente todas as funções celulares. Algumas proteínas encontram-se imersas na membrana plasmática formando canais e bombas que controlam a passagem de pequenas moléculas para dentro e para fora das células. Outras carregam mensagens de uma célula para

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

outra ou ainda agem como integradoras de sinais, direcionando conjuntos sinalizadores da membrana plasmática em direção ao núcleo celular (Alberts *et al.*, 2002).

A troca de informação por meio de moléculas ou mensageiros químicos, constitui o principal meio de comunicação entre as células. As moléculas sinalizadoras são conhecidas como ligantes (Junqueira, 2005). A região onde uma proteína se associa à um ligante, chama-se sítio de ligação do ligante. Como catalizadoras de reações químicas, as enzimas devem ligar-se íntima e especificamente à suas moléculas-alvo, chamadas de substratos (Lodish *et al.*, 2002). As enzimas podem ser agrupadas em classes funcionais, de acordo com as reações químicas que realizam. Dois dos mecanismos mais comuns para regular as atividades das proteínas, são a adição e remoção de grupamentos fosfato de resíduos de serina, treonina ou tirosina, conhecidos como fosforilação e desfosforilação (Junqueira, 2005). Importantes funções celulares são controladas pela fosforilação e desfosforilação de proteínas específicas (Lodish *et al.*, 2002). As proteinoquinases formam um grupo de proteínas que catalizam a fosforilação, favorecendo a ligação de grupos fosfato a outras proteínas (Alberts *et al.*, 2002), em contraste às fosfatases, que por sua vez catalizam a desfosforilação.

Existem numerosas quinases que são estimuladas pelo Complexo Cálcio-Calmodulina (Ca^{2}/CaM). A CaMKII pertence à família das Proteínas Quinases de Serina/Treonina, conhecida como CaM-quinases (CaMKs). As CaMKs mostram-se multifuncionais e possuem um domínio regulamentar homólogo, contendo uma região de autoinibição, que mantém a quinase inativa até o complexo Ca^{2}/ CaM entrar em ação. As subunidades de todas as CaMKs têm estruturas semelhantes de domínio global (terminal N), exceto a CaMKII. Esta subunidade tem um terminal C de domínio de associação (Junqueira, 2005). Em mamíferos, apresenta-se em múltiplas isoformas, codificadas por diferentes genes, tais como α, β, γ e δ que produzem mais de 30 isoformas diferentes, variando em tamanho de 50 a 60 kDa. (Lucchesi *et al.*, 2011). A α-CaMKII, é composta estruturalmente por um domínio catalítico N-terminal e um domínio regulatório auto-inibitório. Além disso, apresenta um domínio de associação com quatro regiões variáveis, o qual permite a formação de uma holoenzima composta por 12 subunidades, organizadas em dois anéis hexaméricos. Seu domínio regulatório contém um sítio para a ligação de Ca^{2+}/CaM, um sítio de ligação para um pseudo substrato capaz de inibir a subunidade catalítica e, por último, alguns

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

sítios de autofosforilação. Especificamente na α-CaMKII, o sítio de autofosforilação no resíduo treonina 286 (Thr_{286}) pertence ao domínio inibitório, enquanto os sítios nos resíduos T_{305} e T_{306} localizam-se no domínio de ligação a Ca^{2+}/CaM. Quando o complexo Ca^{2+}/CaM se liga à região regulatória de α-CaMKII, ocorre uma alteração conformacional capaz de expor o seu domínio catalítico, o qual por sua vez passa a fosforilar seus substratos. Devido a sua estrutura complexa, dois mecanismos distintos de fosforilação são realizados por essa quinase. O primeiro mecanismo ocorre após a ligação do substrato à região catalítica, na qual ocorre a hidrólise de Trifosfato de adenosina (ATP). O segundo mecanismo depende da autofosforilação em Thr_{286} dentro da própria holoenzima, o que torna a atividade de α-CaMKII independente da ligação ao complexo Ca^{2+}/CaM. Após a dissociação desse complexo, observa-se uma atividade autônoma da quinase e a ocorrência de uma segunda onda de autofosforilação em T_{305} e T_{306}, a qual é considerada inibitória visto que previne a religação de Ca^{2+}/CaM. Apesar disso, a atividade autônoma de α-CaMKII continua ocorrendo de forma sustentada, possibilitando a ativação de uma variedade de proteínas (Lucchesi *et al.*, 2011).

A fosforilação de CaMKII se torna bem caracterizada no sítio Thr_{286}. Esta característica altera diretamente a atividade de CaMKII, bem como o seu alvo. A fosforilação em Thr_{286}, gera atividade autônoma, denominada autofosforilação, aumentando o direcionamento de CaMKII para vários locais sub-celulares, incluindo a densidade pós-sináptica (PSD) dos neurônios hipocampais (Skelding, 2011). O primeiro sítio de autofosforilação identificado em ratos foi na Thr_{286} de CaMKII. A fosforilação neste sítio ocorre como uma reação entre uma de suas sub-unidades e requer a presença de Ca^{2+}/CaM ligando a quinase ao substrato. Este sítio encontra-se associado ao desenvolvimento da atividade enzimática de autofosforilação, o qual depende de altos níveis de Ca^{2+} intracelulares, sendo extremamente importante para a plasticidade sináptica (Griffith, 2004).

A CaMKII é uma proteína abundante nos neurônios hipocampais, revelando um papel central no processo de mediação de sinais dos NMDARs. Encontra-se envolvida tanto na plasticidade sináptica, quanto nas associações necessárias para a formação de memórias no cérebro. Acredita-se que o Ca^{2+} ativa a CaMKII através de NMDARs, os quais por sua vez, causam a translocação desta proteína para a PSD. A autofosforilação de αCaMKII ocorre no sítio especifico de Thr_{286} aumentando ainda mais sua afinidade de ligação com Ca^{2+}/CaM, prolongando a associação de αCaMKII no PSD. Isso sugere que

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

a ativação de CaMKII na zona de PSD seja responsável pela potenciação sináptica, provavelmente através do aumento da condutância nos canais de AMPARs. Assim persistindo em estado de indução de CaMKII. A LTP permite que esta estimulação atue como uma memória, tornando-se um dispositivo para o armazenamento de informações (Wang *et al*., 2008).

Os estudos baseados na translocação de CaMKII durante a LTP dependente de canais de NMDA sugerem, que a translocação se mantém persistente durante um período de aproximadamente 90 minutos. Além disso, estes achados levantam a possibilidade de que a CaMKII presente nessas sinapses, possa favorecer a memória de longa duração (Dosemeci *et al.*, 2001). Os mecanismos moleculares envolvidos na indução e manutenção da LTP, são somente compreendidos parcialmente, contudo é aceito atualmente que o influxo de Ca^2 nas fibras colaterais de Schaffer na área CA1 do hipocampo, é um passo importante para a indução de LTP (Lengyel *et al.*, 2004).

Dentre as diferentes funções atribuídas a α-CaMKII, destaca-se a sua participação na cascata de sinalização associada ao desenvolvimento neuronal, à plasticidade e ao comportamento (Wayman *et al.*, 2008). Qualquer alteração que impeça a cascata de eventos e que por ventura venha a impedir a autofosforilação, pode prejudicar severamente a formação de LTP e consequentemente a memória. Isso demonstra a grande importância da LTP para o processo de plasticidade sináptica, aprendizagem e memorização (Wayman *et al.*, 2008).

Uma experiência aversiva, tal como um choque elétrico, em um determinado contexto, resulta na formação de memória de longo prazo de medo ao contexto. Tal experiência induz uma cascata de eventos moleculares em regiões distintas do cérebro, incluindo a liberação de neurotransmissores como glutamato, além da ativação de receptores sinápticos múltiplos, como NMDARs. O influxo de Ca_2 na sinapse promove a ativação de quinases intracelulares, tais como a αCaMKII. A atividade de CaMKII é regulada pela ligação de $Ca^2/$CaM, iniciando o processo de autofosforilação na $Thr_{286.}$

A atividade sináptica é gerada após um estímulo neuronal, promovendo a translocação de α-CaMKII para os terminais pós-sinápticos de neurônios glutamatérgicos. Este processo dá origem a um tipo de marcação específica nas sinapses ativadas, submetendo-as a modificações, as quais promovem o que se conhece como plasticidade sináptica. As proteínas relacionadas a plasticidade

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

se difundem nessas sinapses marcadas, atuando no fortalecimento das mesmas a longo prazo (Redondo *et al.*, 2010; Lucchesi *et al.*, 2011).

Devido ao fato da proteína α-CaMKII exibir uma atividade autônoma cálcio-independente, conhecido como auto-fosforilação, faz-se necessário um mecanismo de feedback negativo para regular sua atividade. As proteínas PP1 e PP2A são as fosfatases responsáveis por remover o grupamento fosfato presente na Thr_{286} de α-CaMKII autofosforilada (Colbran, 2004). Outro mecanismo regulatório ainda mais rápido que este pode ser favorecido por duas outras proteínas inibitórias endógenas: α-CaMKIIN e βCaMKIIN. Estas se ligam à região catalítica da CaMKII, bloqueando tanto sua atividade autônoma quanto aquela dependente de Ca^{2+} (Vest *et al.*, 2007).

2.1. Actina

A actina é uma família de seis proteínas encontradas em humanos e em outros vertebrados. Essas proteínas são: α(ACTC1, músculo cardíaco 1), α1 (ACTA1, músculo esquelético), (ACTA2, músculo liso aórtico), β (ACTB), γ1 (ACTG1) e γ2 (ACTG2, músculo liso entérico). As β1 e γ1 são duas actinas não presentes em músculos, e sim como componentes principais dos microfilamentos. As actinas são altamente conservadas, e as β-actinas de espécies diversas como humanos, ratos e galinhas, são idênticas. A β-actina humana compartilha 90% de homologia com a homóloga dos fungos, e também apresenta pelo menos 93% de similaridade com as outras actinas humanas. Essa homologia, entre os membros da actina e através das espécies, é importante para a seleção dos anticorpos e na interpretação das bandas do western blot. Tanto a β quanto a α-actina são utilizadas como controles de carregamento em western blot. A actina costuma estar presente nas células em altíssimas concentrações, sendo então importante ajustar o volume de aplicação, e o protocolo de western blot, para detectar mudanças nos níveis da actina. A sua síntese é interrompida por mudanças nas condições de cultivo das células. A β-actina também está presente no núcleo, como componente do complexo de remodelamento da cromatina, não podendo ser utilizada como controle para amostras proteicas provenientes do mesmo (Monclaro, 2013).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

3
Objetivo

A proposta do presente estudo foi a de verificar a expressão da α-CaMKII, que se mostra uma quinase fundamental para o processo memória/aprendizagem, nos hipocampos de duas linhagens de ratos com alta ou baixa reatividade ao condicionamento contextual aversivo, utilizando-se a técnica de Western Blotting.

3.1.
Objetivos específicos

(1) Mensurar a concentração de α-CaMKII antes e depois da apresentação de uma situação aversiva;

(2) Uma vez que os grupos CAC e CBC foram selecionados a patir de sua resposta de congelamento a um contexto previamente associado a um estímulo aversivo e que o hipocampo é uma estrutura-chave para a memória contextual do medo, procuramos também investigar as alterações do nível de α-CaMKII em decorrêcia de situação aversiva, comparando a porcentagem de tempo de congelamento após reexposição à situação aversiva em comparação com o mesmo parâmetro sob condições de normalidade em ratos previamente fenotipados.

(3) Tem sido mostrado que padrões naturais de resposta a estímulos aversivos condicionados envolvem diferentes estruturas cerebrais e ativação de vias neuroquímicas distintas. Neste caso, nos interessamos em estudar se a ativação de estruturas já conhecidas, envolvidas no sistema de defesa é igual nas diferentes linhagens. Estruturas como o hipocampo (Eichenbaum, 2004) têm sido apontadas como parte do sistema de defesa, ativadas em situações de ansiedade (Blanchard, Blanchard, 1971).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

4
Metodologia

Para a realização da seleção genética de ratos com alta ou baixa taxa de congelamento foram escolhidos ratos do tipo albino da cepa *Wistar* para serem utilizados no estudo da fenotipagem. A matriz inicial destes animais foi obtida de um criador local (Fundação Oswaldo Cruz) em 1995 e desde então vêm sendo procriados no Biotério do Departamento de Psicologia da Puc-Rio. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ajustada em 22º C e luminosidade controlada em um ciclo intervalar de 12 horas iluminado x 12 horas de escuro. Os animais foram mantidos em grupos de 6 animais em cada caixa, confeccionadas de polietileno e medindo 31 x 38cm, forradas com serragem de madeira (maravalha) com o objetivo de coletar as fezes e urina dos mesmos. Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e comida. Os treinos e testes comportamentais ocorreram durante o período iluminado do ciclo, tendo início sempre às 9 horas. Cinco dias antes do início do experimento, todos os animais eram manuseados uma vez por dia por um período de dois minutos. Todos os protocolos experimentais empregados nestes estudos estiveram em conformidade com as Diretrizes Para o Emprego e o Cuidado de Animais de Laboratório desenvolvidas pelo Instituto Americano de Saúde (National Institutes of Health; publicação número 85 -23, revisada em 1985). O treino e teste de condicionamento contextual aversivo foram realizados em uma caixa experimental quadrangular medindo 25 x 20 x 20 cm. Duas paredes laterais da caixa eram de alumínio e as restantes de acrílico. O assoalho da caixa experimental era composto por 15 barras de metal distando 1.5 cm entre si, permitindo a administração de choques elétricos através de um gerador de choque com misturador de voltagem (AVS, SCR04 São Paulo). Uma interface com oito canais (Insight, Ribeirão Preto) acoplada a um micro computador permitiu a apresentação deste estímulo aversivo. A caixa experimental era sempre limpa imediatamente antes que o animal fosse colocado no seu interior com uma solução de hidróxido de amônia (1%). Este procedimento teve como objetivo eliminar possíveis influências que a urina e as fezes deixadas na caixa por um animal pudessem influenciar o comportamento do animal seguinte. A

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

caixa experimental estava encerrada dentro de uma câmara de isolamento acústico feita de compensado de madeira e revestida por Eucatex acústico. Uma lâmpada vermelha de 25W instalada no teto da câmara permitiu a observação do animal por meio de uma microcâmera instalada no seu interior e conectada a uma placa de captura de vídeo instalada em uma sala adjacente. Um programa de leitura de imagens (Winfast) permitiu a gravação eletrônica das sessões de testes experimentais. Uma ventoinha instalada na câmara de isolamento acústico permitiu a apresentação contínua de um ruído branco de 78dB (escala A). Com objetivo de se produzir uma linhagem de animais com alta taxa de congelamento condicionado (CAC – Cariocas com Alto Congelamento) e outra linhagem com baixa taxa de congelamento condicionado (CBC - Cariocas com baixo Congelamento), 120 ratos (60 machos e 60 fêmeas) constituíram a geração inicial (S^0) para a produção destas duas linhagens. Cada animal foi submetido a um procedimento de condicionamento contextual aversivo. Neste procedimento, o animal era colocado no interior da caixa experimental por oito minutos. Ao término deste período, três choques de 1 mA com duração de um segundo cada eram apresentados com um intervalo de 20 segundos entre choques. Após a apresentação do último choque, o animal permanecia por mais dois minutos, terminando assim a sessão de treino. Cerca de 24 horas após, teve início a sessão de teste. Nesta sessão, o animal era recolocado na caixa experimental por oito minutos. Nenhum choque era apresentado e a resposta de congelamento durante todo este período era registrada por meio de um procedimento de amostragem de tempo. A cada dois segundos, um observador avaliava se o animal apresentava uma postura de congelamento definido como a ausência total de qualquer movimento, exceto aqueles necessários para a respiração. A concordância entre observadores com relação a registro desta resposta em nosso laboratório é de 0,98. Calcado na média da resposta de congelamento durante a sessão de teste, selecionou-se 10 machos e 10 fêmeas com a maior taxa de congelamento para dar início à linhagem CAC assim como 10 machos e 10 fêmeas com a menor taxa de congelamento para dar início à linhagem CBC. Tomou-se o cuidado de evitar cruzamentos consangüíneos (cruzamento entre irmão – irmã), evitando-se assim a endogamia. Das 10 famílias CAC nasceram 76 animais (37 machos e 39 fêmeas) enquanto que as 10 famílias CBC deram origem a 71 animais (34 machos e 37 fêmeas). Estes animais constituíram a primeira geração de animais selecionados (S^1). Entre 6 e 8 dias após o nascimento, cada filhote recebeu um corte em uma das orelhas com objetivo de designar a sua linhagem (CAC – corte na orelha direita; CBC –

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

corte na orelha esquerda). Um segundo sistema de marcação, realizado através da ablação de um ou mais dedos das patas do animal também foi realizado durante este período. Aos 21 dias de idade, os animais destas 20 famílias foram separados por sexo e alojados em grupos de 6 a 8 animais. Os animais eram sempre agrupados respeitando-se suas respectivas linhagens. Ao atingirem a idade de aproximadamente três meses, cada um destes animais foi submetido às sessões de treino e teste de condicionamento contextual aversivo. A média da resposta de congelamento durante a sessão de teste foi utilizada novamente como critério para a seleção de 10 novas famílias com as maiores taxas de congelamento e 10 novas famílias com as menores taxas de congelamento. Este mesmo procedimento foi utilizado para a produção de duas novas gerações selecionadas de animais (S2 e S3), e assim sucessivamente.

4.1. Sujeitos

Foram utilizados neste experimento 64 ratos machos, com aproximadamente 110 dias de idade e pesando entre 250 e 300g. O presente estudo empregou animais de uma nova geração (S^{15}) da linhagem CAC e CBC, como também animais controle (CTR), que são animais provenientes de cruzamento randomizado de ratos Wistar da mesma colônia. Utilizou ainda animais Naive, que são animais que não são submetidos a nenhum tipo de experimento. Esta nova geração foi produzida a partir da geração (S^{14}) seguindo-se exatamente o mesmo procedimento descrito anteriormente.

Diferenças de comportamento de congelamento defensivo em resposta a estímulos contextuais previamente associados a choques nas patas, representam uma importante e poderosa ferramenta para investigar o papel das variáveis genéticas na ocorrência de diferentes transtornos de ansiedade (um modelo animal de transtorno de ansiedade generalizada). Os resultados indicam que estas duas novas linhagens de ratos, aos quais nos referimos como CAC e CBC mostram uma diferença confiável no congelamento condicionado depois de três gerações de seleção (Landeira-Fernandez *et al.*, 2006).

4.2. Equipamentos

O processo de fenotipagem dos animais foi realizado com a utilização de uma caixa de condicionamento aversivo (25x20x20) (Insight, Brasil), colocada

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

dentro de uma outra caixa atenuadora de som. A caixa era iluminada por luz vermelha (25W), com som controlado por gerador de ruído brando de 78dB. O chão da caixa possuía assoalho gradeado (15 barras de aço inoxidável, espaçadas a 1,5cm) a fim de permitir a passagem de choques elétricos. A corrente elétrica de 0,5 mA ⁄ 1s, era liberada por meio de um estimulador de choques (Insight, Brasil). Uma solução de hidróxido de amônia a 10% foi utilizada para a limpeza da caixa depois de cada utilização. Os comportamentos foram registrados e gravados com o programa Geo Vision GV800 (PCI Systems, Reino Unido), instalado num computador em sala anexa à sala de experimentação.

Figura 3 - Caixa de contexto colocada dentro de uma caixa atenuadora de som e Programa de Computação Geo Vision.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

5
Procedimentos

5.1.
Treino comportamental

Todos os animais utilizados nos experimentos (exceto os Naive) foram submetidos ao teste de medo condicionado ao completarem aproximadamente o dia PN90 para que fosse comprovada a sua expressão fenotípica. O objetivo desse procedimento é separar os animais que exibem o comportamento ansioso (filhotes de CAC) e não ansioso (filhotes de CBC) comparado com os animais CTR, que por sua vez são filhotes de cruzamento randomizado de ratos Wistar da mesma colônia. Como apresentado na Figura 4, na sessão de treino, cada animal foi colocado individualmente na caixa experimental por 8 minutos, correspondente ao período de habituação. Em seguida, foram apresentados tres choques de 0,6 mA, com duração de 1 segundo cada e intervalo de 20 segundos entre os choques. Após esse primeiro procedimento, o animal permanecia na caixa por 3 minutos, sendo retirado e levado de volta para a caixa de moradia. Vinte e quatro horas depois, o animal foi recolocado na caixa por 8 minutos e filmado, por meio de uma câmara acoplada à caixa. Foi registrado o tempo em que exibia a resposta de congelamento, definida como ausência total de movimentos, exceto àqueles indispensáveis à respiração. Todos os animais selecionados para os testes desse experimento expressavam o comportamento relativo à sua linhagem. Esperaram-se dois meses para a continuação dos experimentos, tempo necessário para o acasalamento dos casais de animais mais ansiosos, como também dos menos ansiosos (fenotipagem).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

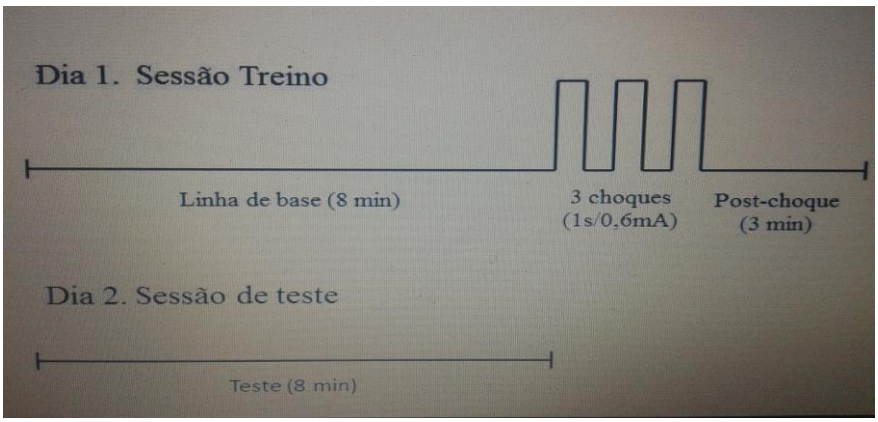

Figura 4 - Esquema do paradigma de fenotipagem.Traduzido de Gomes (2012).

Ao final do período de fenotipagem, 64 ratos machos CAC (N=16); CBC N=16; CTR (N=16) e Naive (N=16) foram reagrupados em caixas viveiros para seguirem com o experimento. Este tipo de procedimento foi realizado, dividindo-se primeiramente cada um dos grupos em dois sub-grupos, compostos de 8 animais cada.

Tabela 1 - Delineamento experimental. 16 animais de cada grupo separados em 2 sub-grupos, para entrada e não-entrada na caixa-teste.

GRUPOS	INBOX	OUTBOX
CAC	8	8
CBC	8	8
CTR	8	8
NAIVE	8	8

O sub-grupo INBOX foi reconduzido novamente à caixa de condicionamento por 6 minutos, sem a apresentação de choque. Os comportamentos foram registrados e gravados com o programa Geo Vision GV800 (PCI Systems, Reino Unido), instalado num computador em sala anexa à sala de experimentação. Após este procedimento, cada animal era mantido por período adicional de 54 minutos em caixas individuais. O sub-grupo Outbox, foi somente separado em caixas individuais, semelhantes às caixas de moradia, por período de 60 minutos, não passando pela caixa de teste. Os experimentadores que levaram os animais para as caixas, foram os mesmos que realizaram as habituações (*handling*) nos animais. Cada animal foi reintroduzido na mesma caixa de condicionamento utilizada na primeira fase do experimento.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

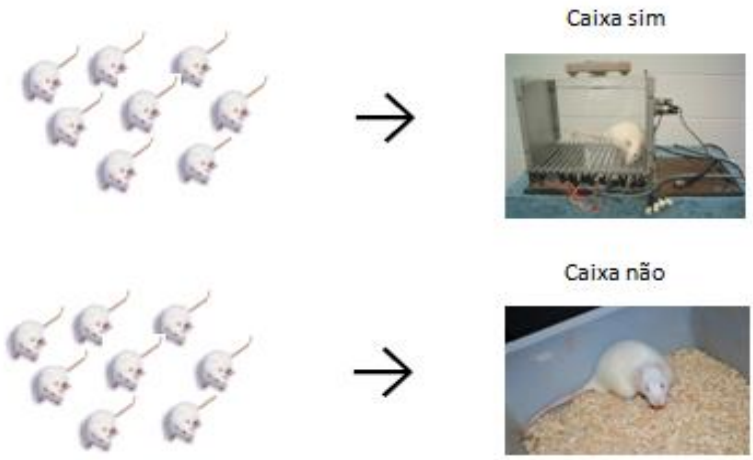

Figura 5 - Design experimental.

Após 60 minutos, a contar do momento de entrada na caixa de teste ou de moradia, os animais receberam uma dose específica de Hidrato de Cloral (1 mL/100 g) e em seguida foram decaptados com uma mini-guilhotina. Os hipocampos foram rapidamente removidos e as amostras do material acondicionadas em eppendorfs (Sarsted, Alemanha) e armazenadas a -80 ^{0}C (Ultra Freezer CL 120 80 V, Coldlab, SP) até o momento da análise.

5.1.1
Método de Western-Blotting

Western Blotting ou *immunoblotting* é um procedimento em biologia molecular e bioquímica para detecção de uma proteína específica em um homogenato (células bem trituradas) ou um extrato de tecido biológico. Ė um dos métodos atuais mais sensíveis, combinando o poder de resolução da eletroforese em gel, a especificidade dos anticorpos e a sensibilidade dos ensaios enzimáticos (Lodish *et al.*, 2002).

A.
Etapa I – Preparo das amostras

As amostras de hipocampo foram retiradas do freezer (- 80 ^{0}C) e mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos. Após este período foram transferidas para pilão de vidro, adicionando 5 mL de tampão de Lise gelado, composto de 11,8 g de Hepes (50 mM) + 2,03 g de $MgCl^{2+}$ (1 mM) + 3,72 g de EDTA (10 mM) + 10 ml de Triton x-100% + 1 µL de coquetel de inibidores de protease para cada mL de tampão de Lise. As amostras foram homogeneizadas manualmente durante aproximadamente 3 min. Após este procedimento, o material foi transferido para frascos do tipo *eppendorf* e depois centrifugado a 13.000 rpm

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

por 10 minutos a 4 °C em centrífuga para microtubos refrigerada, modelo Mikro 220R Hettich, Alemanha (Figura 6).

Figura 6 - Centrífuga modelo Mikro 220R Hettich, Alemanha.

Após a primeira etapa de centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para novos frascos do tipo eppendorfe estéreis e novamente centrifugados, desta vez a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes finais foram transferidos para microtubos estéreis em alíquotas de 20 µL e mantidas em freezer (-80^{0}C) até utilização.

B.
Etapa II – Determinação de proteínas totais

A dosagem protéica realizada seguiu o protocolo modificado por Peterson (1977), otimizado para microdosagem. Baseia-se na interação das proteínas com o reagente fenol e cobre em condições alcalinas. A reação colorimétrica envolve uma oxidação, catalisada por cobre e aminoácidos aromáticos por um reagente heteropolifosfato (fosfotungístico-fosfomolibídico), desenvolvendo uma cor azul que é medida em um colorímetro e comparada com uma curva padrão.

Foi preparada uma solução "1" (denominada CTC), composta de sulfato de cobre 0,125 %, tartarato de sódio e potássio 0,250 % e carbonato de sódio 1,25 %, avolumando a 12,5 mL de água ultra-pura em tubo falcon de 15 mL. Esta solução é estável em temperatura ambiente, quando mantida ao abrigo de luz por até 1 mês. Foram preparadas duas soluções: "Reativo A", composto de NaOH (0,8 M), 0,4 g, avolumando a 12,5 mL com água ultra-pura e SDS (10%), 1,25 g avolumando a 12,5 mL de água ultra-pura e "Reativo B", composto de Follin-Ciocalteau (Sigma-Aldrich) diluído 5x com água ultra-pura. Juntou-se 12,5 mL de CTC + 12,5 mL de NaOH + 12,5 mL de SDS, avolumando a 12,5 mL de água ultra-pura. A curva analítica foi preparada em microtubos de 2 mL com sucessivas diluições de solução de albumina bovina sérica (BSA- Bovine Serum

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Albumin, Sigma-Aldrich), 2 mg $mL^{-}1$, pesando 0,002 g de BSA e avolumando para 1 mL com água ultra-pura, em uma faixa de 0 a 50 µg mL^{-1}.

Uma alíquota de cada amostra contendo 10 µL foi reservada para o processo de quantificação. Para cada amostra e padrão foram adicionados 400 µL do "reativo A" em cada microtubo. Os mesmos foram agitados manual e rapidamente, sendo deixados em descanso por 10 min. Adicionou-se 200 µL do "reativo B" em cada microtubo, agitando-se novamente. Após mais um período de descanso de 30 min., a leitura das amostras e da curva analítica foi realizada em leitor de microplacas (*Spectramax Hamilton* 190) a 750 nm (Figura 7).

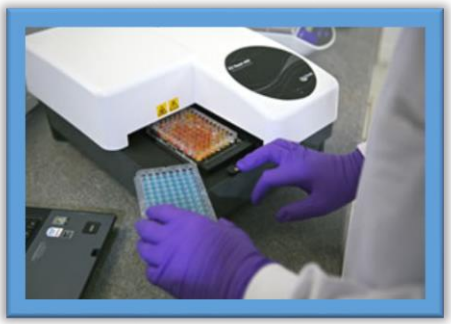

Figura 7 - Leitor de Microplacas Spectramax Hamilton 190.

5.1.2
Corrida SDS-PAGE unidimensional

Os géis foram preparados em um sistema Mini-Protean Tetra Cell and PowerPac HC Power Supply-165-8027 da Bio-Rad. Os géis de separação foram preparados a 10 %, contendo Acrilamida 30 % + bisacrilamida 0.8 %, Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8), SDS 10 %, Água ultra-pura, PSA (10 %) e TEMED.

Os géis de empilhamento foram preparados a 4 %, contendo Acrilamida 30 % + bisacrilamida 0.8 %, Tris-HCl 0.5 (pH 6.8), SDS 10 %, Água ultra-pura, PSA (10 %) e TEMED. Para as corridas 1D, as amostras centrifugadas e dosadas de hipocampo foram homogeneizadas na proporção de 1:1 com o tampão de amostra composto de 10 % SDS (p/v), ß-mercaptoetanol 10 nM,10 % glicerol (v/v), 0,2 M Tris (pH 6,8) e 0,05 % Bromophenol Blue (p/v), fervidas por 5 minutos (100 ^{0}C) e então aplicadas em géis de 10 % de poliacrilamida. As corridas consistiram de uma etapa de 1h e 40 min. à 0.05 mA/gel do início ao fim.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

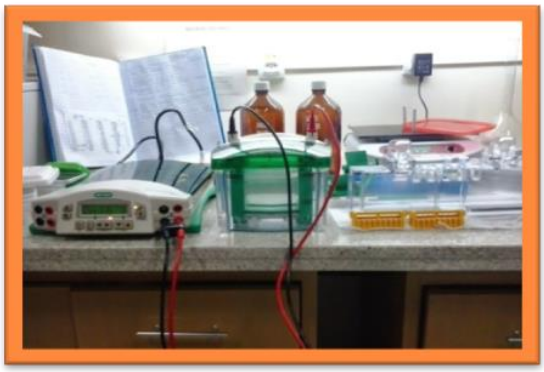

Figura 8 - Aparelho de Corrida de Géis de Poliacrilamida Mini-Protean Tetra Cell and PowerPac HC Power Supply-165-8027 da (Bio-Rad).

5.1.3
Transferência e "imunoblotting"

Após o processo de separação das proteínas, as mesmas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em Voltagem de 20 V. O tempo de transferência utilizado foi 7 min., padrão especificado pelo fabricante em equipamento *iBlot® Dry Blotting System* (Figura 9).

Figura 9 - Aparelho de Transferência de Membranas de Nitrocelulose Semi-Seco *iBlot® Dry Blotting System.*

Após a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para as membranas de nitrocelulose, as mesmas foram coradas por 5 min com Vermelho de Ponceau, para confirmação de que o processo havia sido realizado satisfatoriamente.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

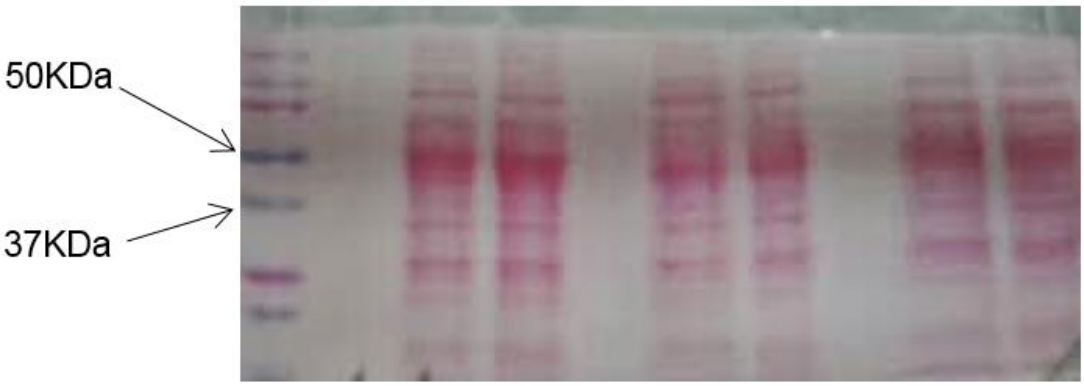

Figura 10 - Foto de membrana de Nitrocelulose corada com Vermelho de Ponceau contendo proteínas após transferência.

Os sítios inespecíficos das proteínas foram bloqueados com BSA (5%) por 30 min. e em seguida, lavadas por 3 x T-TBS por 5 min. cada. Posteriormente, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários (A_c1): Anti-CaM Kinase II – rabbit polyclonal – (1:2000) - (Millipore), Anti - Actin antibody - rabbit polyclonal – (1:1000) - (Sigma), ficando de um dia para o outro ("*overnight*") em temperatura a 4^0C, em agitação constante.

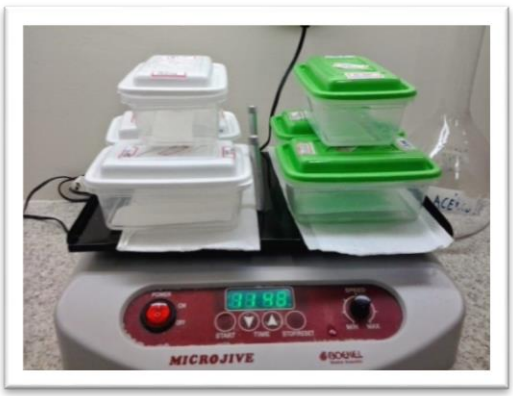

Figura 11 - Membranas de Nitrocelulose em aparelho misturador Microjive para ambientação.

No dia seguinte, as membranas foram retiradas de refrigeração, permanecendo em temperatura ambiente por um período adicional de 60 min em constante agitação. Ao término deste tempo, foram lavadas com T-TBS por 5 min em um total de 3 lavagens. Após este procedimento, foram incubadas com os anticorpos secundários (Ac2): Anti-Rabbit IgG (Whole Molecule) – Peroxidase. Developed in Goat. Affinity isolated antigen specific antibody – (1:10000) - (Sigma), em ambiente protegido de luz. Os recipientes foram cobertos com papel alumínio, ficando em constante agitação por 60 min. Após este período, foram lavadas com T-TBS por 5 min em um total de 3 lavagens.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

A proteína β-actina foi utilizada como *housekeeping protein,* por constituir um dos 6 isómeros da actina que se encontra de forma estável no citoesqueleto das células, participando na estrutura, mobilidade e coesão celular. A sua expressão na célula é constante e relativamente elevada, sendo considerada uma proteína de referência (Roisean *et al.*, 2005). Para assegurar que nas diferentes amostras a estudar existia a mesma quantidade de proteína total, realizaram-se *loading controls*. Para o efeito, carregaram-se em paralelo amostras para quantificação da proteína a investigar (α-CaMKII) e para a *housekeeping protein*. Neste estudo, os *loading controls* foram realizados com a β-actina, servindo a sua marca de deteção como referência para as diferenças de expressão da proteína a estudar.

5.1.4
Revelação dos géis

A luminescência foi detectada, conforme pode ser vista na figura 5, por Kit de revelação comercial ECL-plus, do fabricante GE®. Este, consiste em reagente para detecção de anticorpos secundários marcados com peroxidase. As membranas foram incubadas com um total de 2mL para cada membrana, de acordo com a instrução do fabricante por um período de 5 minutos. As soluções foram preparadas em ambiente protegido de luz e os recipientes envoltos em papel alumínio e mantidas paradas durante este período.

Figura 12 - Membranas de Nitrocelulose em Chassis de revelação.

As revelações foram realizadas em equipamento de raio-X, com filmes *Kodak*, tipo X-OMAT.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Figura 13 - Aparelho de Revelação de Membranas de Nitrocelulose do Hospital Miguel Couto.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

A imunorreatividade foi avaliada, quantitativamente, por densitometria óptica utilizando-se o programa Scion Image Software (Scion Corporation, MD, USA).

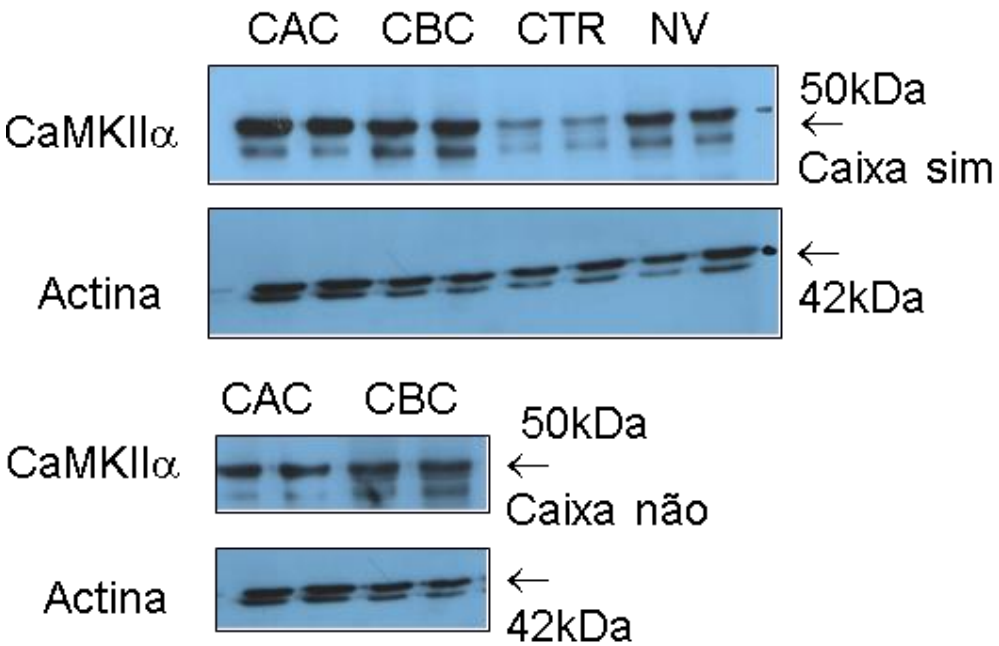

Figura 14 - Western blotting de padronização das proteínas αCaMKII (50kDa). Amostras da proteína (30µg) no hipocampo de ratos Wistar “Cariocas” e “Naives” adultos (grupos: CAC, CBC, CTR e Naive) foram submetidas à immunoblotting (anti-CaMKII).

6
Estatística

O software utilizado para as análises foi o Systat Software, Inc. Versão 3,5. (EUA). Os dados são apresentados como médias ±EPM (erro padrão da média). Os resultados comportamentais (tempo total de congelamento) assim como os resultados da expressão de CaMKII e Actina antes e após o modelo de medo condicionado foram analisados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) de um fator e as diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$. Após a verificação da distribuição normal dos dados, o teste paramétrico teste-t foi utilizado. O teste de correlação LSD (*least-significance difference*) foi aplicado para verificar a existência de correlações entre as linhagens e os locais de teste. As diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

7
Resultados

Num primeiro momento, os dados comportamentais dos animais que passaram 6 min. na caixa de teste foram submetidos ao teste estatístico denominado ANOVA de medidas repetidas. A ANOVA (Analysis of Variance) permite testar diferenças entre três ou mais condições. Este teste é apropriado para dados extraídos de populações normais. É um teste paramétrico, que fornece a chance de se obter uma diferença entre algumas ou todas as condições por erro de amostragem. Os chamados testes post hoc mostram as condições que diferem de forma significativa de qualquer outra condição.

O estudo em questão contempla quatro diferentes grupos, sendo que cada participante é testado sob todas as condições (6 min. de marcação de postura). As hipóteses de normalidade, homogeneidade e esferacidade foram satisfeitas. Os resultados mostraram ser improvável que as diferenças entre as condições tenham se originado somente em virtude de erro amostral ($F(5,160) = 7.610$ com $P< 0,002$). Foram analisadas também, as Médias, o Desvio-Padrão e o Erro Padrão da Média (±SEM). Posteriormente, os resultados foram submetidos ao teste post hoc (LSD). Esta complementação possibilita mostrar as condições que diferem de forma significativa de qualquer outra condição. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Tabela 2 - Média, Desvio-Padrão e Erro Padrão da Média de cada um dos quatro grupos de animais. Os dados referem-se à média da porcentagem de tempo de cada minuto em que cada grupo permaneceu na postura de congelamento dentro da caixa de teste.

CONGELAMENTO		Minuto 1	Minuto 2	Minuto 3	Minuto 4	Minuto 5	Minuto 6
CAC	Média	7,11	7,44	6,22	5,67	5,67	4,44
	Desvio Padrão	1,453	1,667	1,787	2,449	3,082	3,504
	Erro Padrão da Média	0,484	0,556	0,596	0,816	1,027	1,168
CBC	Média	0,90	1,60	2,10	1,50	1,20	1,50
	Desvio Padrão	1,287	2,271	2,378	1,900	2,486	1,269
	Erro Padrão da Média	0,407	0,718	0,752	0,601	0,786	0,401
CTR	Média	3,25	5,63	5,13	3,25	0,63	1,38
	Desvio Padrão	3,412	2,669	2,642	1,982	0,916	2,066
	Erro Padrão da Média	1,206	0,944	0,934	0,701	0,324	0,730
NAIVE	Média	0,11	0,11	0,67	0,56	0,22	0,33
	Desvio Padrão	0,333	0,333	1,658	1,130	0,667	0,707
	Erro Padrão da Média	0,111	0,111	0,553	0,377	0,222	0,236
Total	Média	2,78	3,58	3,44	2,69	1,94	1,92
	Desvio Padrão	3,313	3,524	3,056	2,703	2,985	2,568
	Erro Padrão da Média	0,552	0,587	0,509	0,450	0,498	0,428

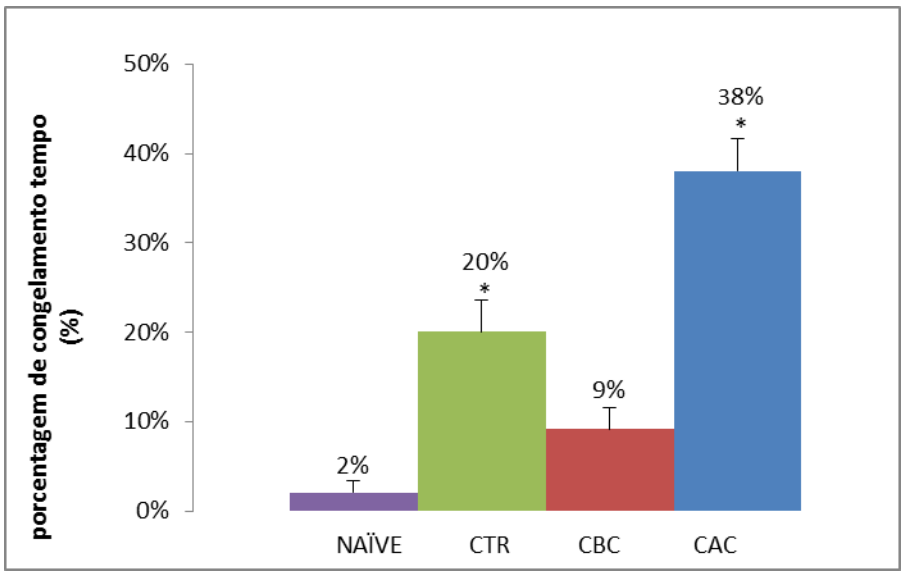

Figura 15 - Média (±SEM) da porcentagem de tempo de congelamento nos quatro grupos de animais. * = diferente do grupo Naive ($p < 0,001$).

A ANOVA mostrou que houve diferenças, estatisticamente, significantes na porcentagem do tempo de congelamento ao longo dos seis minutos do teste ($F[3,32]=30.99$; $P<0,001$). A comparação post hoc das médias dos grupos mostrou que os animais do grupo Naïve apresentaram uma menor porcentagem de tempo em congelamento do que os animais dos grupos CAC e CTR ($P<0,001$).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

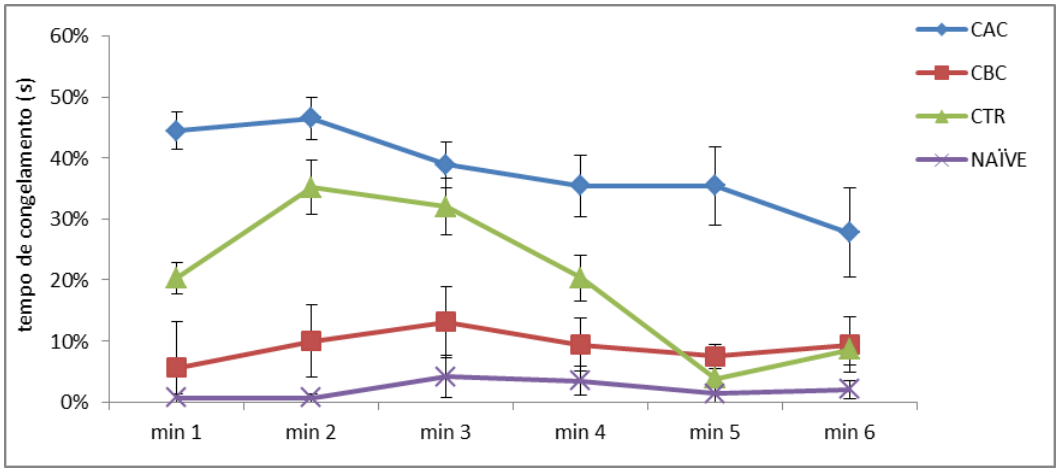

Figura 16 - Mostra a média (± SEM) de porcentagem de tempo em que os animais apresentaram postura de congelamento na caixa de teste. A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo.

Tabela 3 - Média de α-CaMK, Actina e α-CaMKII/Actina. Os dados referem-se à média dos valores obtidos(pixels) do grupo CAC.

CAC	Média αCaMKII	Média Actina	Média α-CaMK/Actina
8S	11,720,167	12,382,121	0.946539531
10S	13,645,203	15,706,242	0.868775803
13S	10,899,418	11,690,843	0.932303855
67S	12,807,974	11,853,696	1.08050468
74S	11,496,459	12,728,731	0.903189721
92S	14,391,506	12,230,724	1.176668364
123S	11,612,085	12,265,297	0.946743075
132S	13,454,656	13,221,762	1.017614445
		Média	0.984042434
39N	9,283,953	13,891,853	0.66830199
47N	8,576,037	11,180,127	0.767078675
50N	7,129,882	9,884,763	0.935614779
69N	8,880,385	11,690,843	0.759601767
78N	4,332,008	9,265,297	0.467551985
97N	6,682,615	7,760,305	0.861127881
99N	6,468,322	10,070,393	0,64231078
31N	8,055,087	9,888,581	0.81458472
		Média	0.753408828

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Tabela 4 - Média de α-CaMKII, Actina e α-CaMKII/Actina. Os dados referem-se à média dos valores obtidos(pixels) do grupo CBC.

CBC	Média α-CaMKII	Média Actina	Média α-CaMKII/Actina
40S	11,081,782	12,820,924	0.86435127
59S	9,091,861	10,878,368	0.83577428
60S	12,520,560	20,205,963	0.619646784
67S	11,439,803	16,518,525	0.69254386
68S	9,470,095	11,062,024	0.85609062
69S	9,824,640	11,849,489	0.8291193
85S	12,357,853	14,103,974	0.87619652
126S	14,812,095	16,875,157	0.877745611
		Média	0.806433531
3N	6,299,761	9,023,874	0.69812156
18N	4,845,276	6,203,045	0.7811125
22N	7,550,731	10,466,874	0.72139313
25N	7,197,054	9,755,008	0.73778043
49N	4,668,196	6,235,347	0.74866659
65N	5,236,619	7,129,882	0.73446082
96N	5,824,872	8,821,974	0.660268552
61N	7,290,276	9,102,874	0.80087629
		Média	0.735334984

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Tabela 5 - Média de CaMK, Actina e CaMK/Actina. Os dados referem-se à média dos valores obtidos(pixels) do grupo CTR.

CTR	Média α-CaMKII	Média Actina	Média α-CaMKII/Actina
6S	8.864.497	10.058.602	0,88128519
14S	8.233.882	9.932.832	0,828956133
23S	9.017.146	9.259.004	0,97387862
59S	10.810.449	11.941.474	0,905285981
76S	11.718.313	12.549.752	0,933748571
94S	7.681.625	9.899.056	0,775995711
102S	10.181.095	10.561.368	0,963993964
117S	7.429.778	9.559.832	0,777187089
		Média	0,880041407
26N	6.235.347	8.777.522	0,710376687
36N	8.204.317	10.774.238	0,761475382
40N	6.646.589	8.859.865	0,750190776
42N	6.290.447	6.896.815	0,910630052
47N	7.224.589	10.440.100	0,692003812
80N	7.158.953	9.090.752	0,787498438
103N	6.850.033	8.077.368	0,848052608
60N	6.879.175	8.292.208	0,829595085
		Média	0,786227855

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Tabela 6 - Média de α-CaMKII, Actina e α-CaMK/Actina. Os dados referem-se à média dos valores obtidos(pixels) do grupo Naive.

Naive	Média α-CaMK	Média Actina	Média α-CaMK/Actina
1A	4,666,296	6,286,397	0.74228465
1V	9,657,731	13,057,125	0.73965218
1P	7,493,539	10,520,246	0.71229694
1R	6,653,832	10,778,903	0.61730141
1CR	5,349,054	8,814,276	0.60686255
1CCL	7,301,589	9,088,225	0.80341200
1VP	10,020,095	12,397,589	0.80822933
1CV	6,559,569	9,692,468	0.67676974
		Média	0.71335110
2A	7,522,397	11,131,347	0.67578497
2V	4,227,175	7,487,154	0.56459036
2P	8,022,468	11,010,225	0.72863797
2R	5,081,326	7,296,711	0.69638581
2CR	4,594,397	6,142,861	0.74792462
2CCL	9,642,953	11,769,368	0.811932632
2RR	5,168,518	7,549,761	0.68459359
2CV	10,514,610	15,200,196	0.69174174
		Média	0.700198962

Como pode ser observado na figura a seguir, há significativa diferença na expressão da proteína CaMKII entre os grupos CAC e CBC. O nível de expressão dessa proteína nos animais CAC é maior do que nos animais CBC.

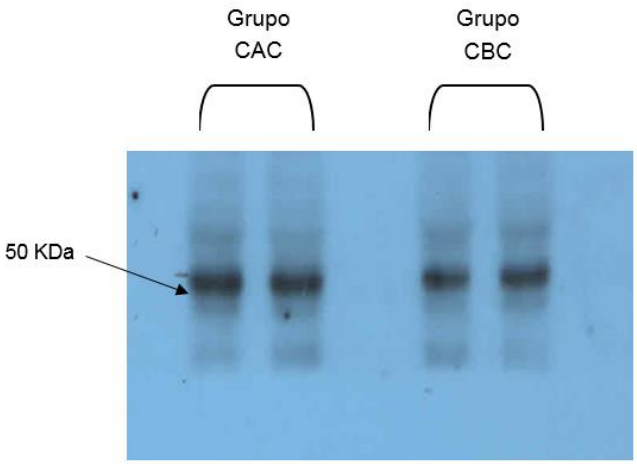

Figura 17 - Revelação de proteínas.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Na figura seguinte apresentamos, um exemplo de imagem das revelações, segundo o software Image J que configura o espaço entre as bandas de proteínas de forma padronizada (com valores em pixels[1]).

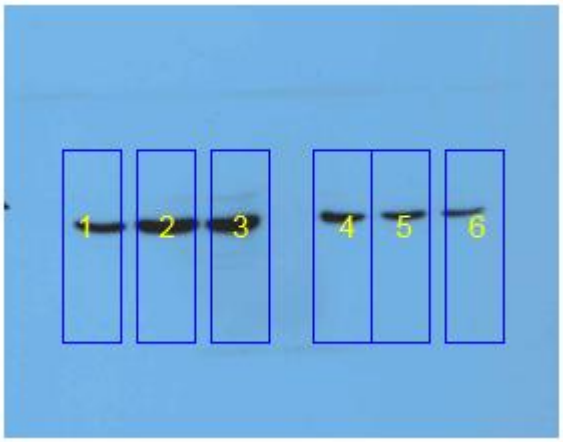

Figura 18 - Imagem das revelações das bandas de proteínas para análise através do software image J

Abaixo apresentamos exemplo da forma com que o programa Image J plota as revelações das membranas de proteínas. O programa possibilita a operação da média das densidades absolutas das triplicatas. A partir desta média, podemos encontrar a razão da média das proteínas CaMKII sobre a média da Actina.

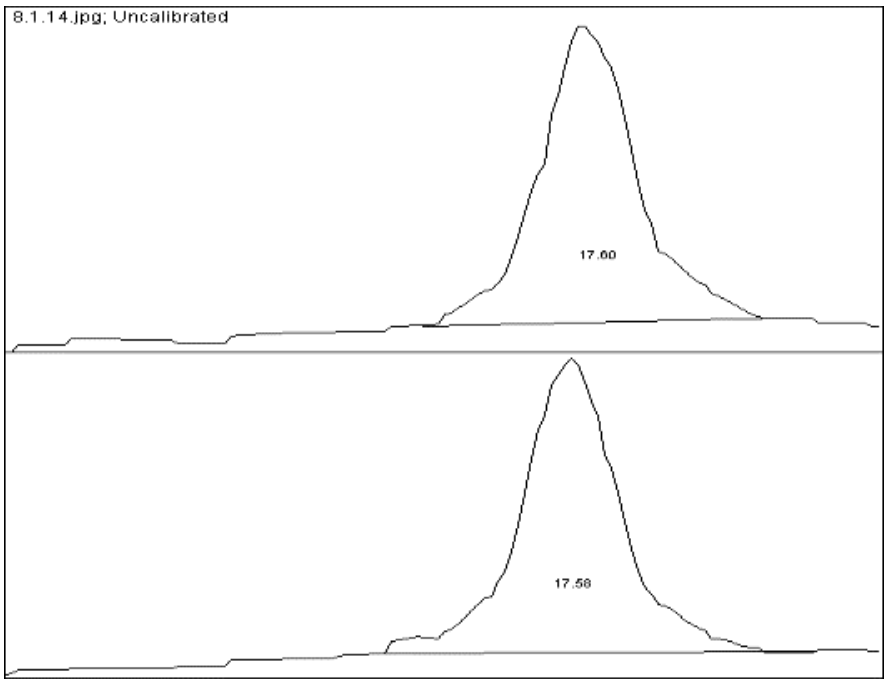

Figura 19 - Exemplo de resultado em forma de gráfico segundo o Image J

[1] Um pixel é considerado o menor componente de uma imagem digital.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

Para fazer as comparações entre os níveis de α-CaMKII expressos no hipocampo das linhagens Cariocas, empregamos uma análise de variância (ANOVA) de 2 fatores. O primeiro fator foi “sujeitos experimentais”, com 4 níveis (CAC, CBC, CTRL e Naive); o segundo fator, com 2 níveis, foi o local do teste (dentro – Inbox - e fora – Outbox - da caixa de condicionamento). A ANOVA mostrou haver uma interação de duas vias entre os fatores linhagem e local do teste ($F_{3,56}$=8,24; p<0,001), assim como efeitos principais de sujeitos experimentais ($F_{3,56}$=9,07; p<0,001) e de local do teste ($F_{1,56}$=63,27; p<0,001). Comparações post-hoc com teste t de student mostraram haver diferenças significativas entre os animais CAC, CBC e CTRL "inbox" e os respectivos grupos "outbox" (todos p’s <0,05). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos "inbox" e "outbox" dos animais Naive. É importante observar que o grupo "Naive", como o nome sugere, é formado por animais que não foram submetidos ao teste de condicionamento contextual aversivo.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

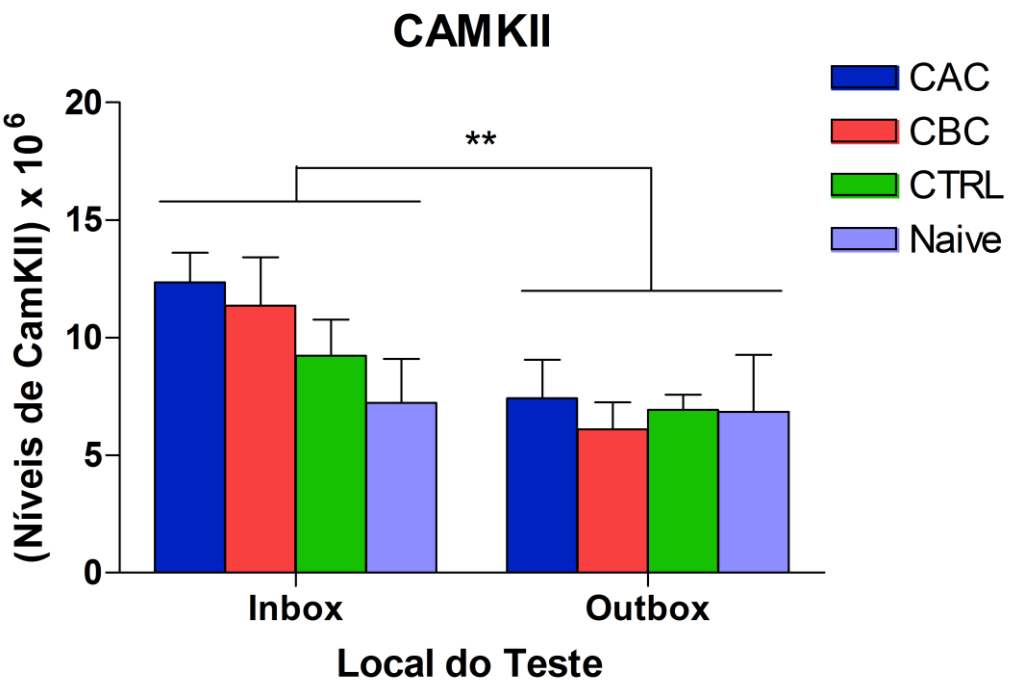

Figura 20 - Resultados obtidos como média de α-CaMKII expressos no hipocampo (*+* EPM).

A análise de variância mostrou efeitos principais de sujeitos experimentais e local do teste, assim como a interação entre estes dois fatores (todos p's <0,001). Comparações através do teste-t de student mostraram diferenças significativas entre os grupos “Inbox” e “Outbox” para as linhagens CAC, CBC e CTRL (p's<0,05). Entretanto, não foi observado

diferença estatisticamente significativa entre os grupos Naive “Inbox” e “Outbox” (p>0,05).

Resultados com a proteína Actina também mostraram haver uma interação de 2 fatores ($F_{3,56}$=5,18; p<0,05), assim como efeitos principais de sujeitos experimentais ($F_{3,56}$=3,44; p<0,05) e de local do teste ($F_{1,56}$=23,43;p<0,05). Comparações post-hoc com teste t de student mostraram haver diferenças significativas entre os grupos inbox e outbox dos animais CAC, CBC e CTRL (todos p’s <0,05). Novamente, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos "inbox" e "outbox", compostos por animais Naive (p>0,05).

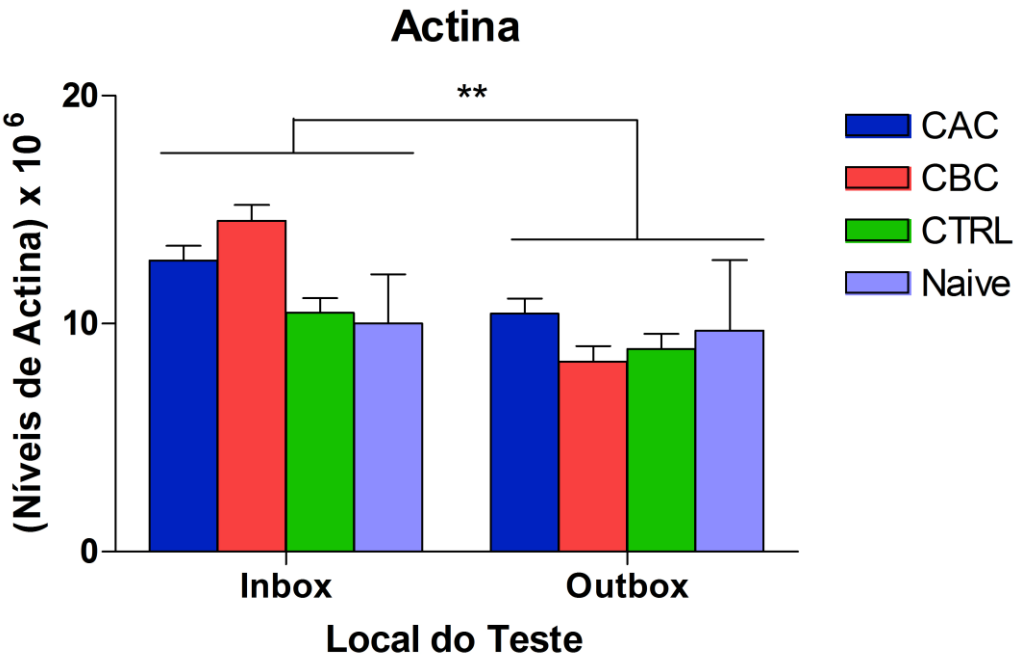

Figura 21 - Resultados obtidos como média de Actina expressos no hipocampo (*±* EPM).

A análise de variância mostrou efeitos principais de sujeitos experimentais e local do teste, assim como a interação entre estes dois fatores (todos p's <0,001). Comparações através do teste-t de student mostraram diferenças significativas entre os grupos “Inbox” e “Outbox” para os linhagens CAC, CBC e CTRL (p's<0,05). Entretanto, não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos Naive “Inbox” e “Outbox” (p>0,05).

Para fazer as comparações entre os níveis de α-CaMKII/Actina expressos no hipocampo das linhagens Cariocas, empregamos a mesma análise de variância (ANOVA) de 2 fatores. A ANOVA mostrou haver uma interação de duas vias entre os fatores linhagem e local do teste ($F_{3,56}$=4,77; p<0,001), como

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

efeitos principais de sujeitos experimentais ($F_{3,56}$=9,33; p<0,001) e de local do teste ($F_{1,56}$=21,9; p<0,001). Comparações post-hoc com teste t de student mostraram haver diferenças significativas entre os grupos inbox e outbox formados pelos grupos CAC, CBC e CTRL (todos p's <0,05). Mais ainda, não observamos diferenças significativas entre animais "naive" dos grupos "inbox" e "outbox" (p>0,05). Finalmente, observamos que o grupo CAC "inbox"se diferenciou de forma significativa tanto dos animais CBC e CTRL quanto dos animais Naive "inbox" (todos os p's<0,05).

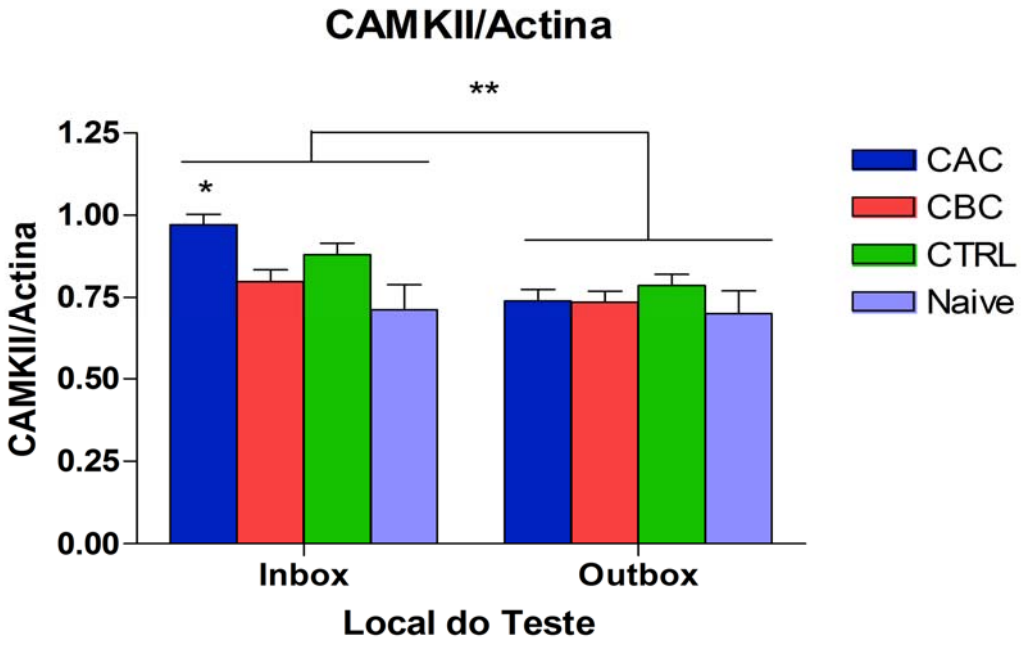

Figura 22 - Resultados mostrados como níveis médios da razão entre α-CaMKII e Actina (*±* EPM).

A análise de variância mostrou efeitos principais de sujeitos experimentais e local do teste, assim como a interação entre estes dois fatores (todos p's <0,001). Comparações com teste-t mostraram diferenças significativas entre os grupos "inbox" e "outbox" (p<0,05). Mais ainda, observamos diferenças significativas entre os animais CAC e CBC "inbox", assim como entre o grupos CAC e CTRL "inbox" e CAC e Naive "inbox" (todos p's<0,001); novamente, não foi observado diferenças significativas entre os grupos Naive "inbox" e "outbox". * denota diferença entre os grupo CAC e os demais grupos.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

8
Discussão e Conclusões

A ansiedade diante de situações adversas é um fenômeno tipicamente humano. Contudo, os estudos mostram que pode existir alguma correlação entre certos tipos de ansiedade e comportamentos de defesa expressa por animais diante de alguns estímulos ou situações de perigo (Galvão, 2012). O comportamento de congelamento parece ser a principal resposta condicionada de um animal frente a esses estímulos adversos. Trabalhos com ratos geneticamente selecionados para alto e baixo nível de emocionalidade representam uma importante ferramenta na investigação da relação entre os diferentes aspectos que envolvem os transtornos de ansiedade (Gomes, Landeira-Fernandez, 2008). Evidências consideráveis indicam a importância do condicionamento de medo ao contexto no entendimento do comportamento ansiogênico em animais. Neste paradigma específico, a resposta de congelamento a estímulos contextuais previamente associados a choque nas patas é um dos modelos animais mais confiáveis para ansiedade antecipatória (Brandão *et al.*, 2008). Num experimento típico, um rato é exposto a um ambiente novo (caixa experimental) e, passado um período (aprox. 6 min.), breves e não sinalizados, choques nas patas são apresentados. No dia seguinte, ao retornar à caixa experimental, o animal faz o comportamento de congelamento na ausência de choque nas patas (Landeira-Fernandez, 1996). O congelamento é definido como uma completa ausência de movimento corporal, excetuando àqueles responsáveis pela respiração (Bolles, Collier, 1976).

No presente trabalho, os animais utilizados foram selecionados aleatoriamente de linhagens CAC e CBC do Laboratório de Neurociências da PUC-Rio. No processo de fenotipagem, esses animais passam pelo modelo de medo condicionado ao contexto descrito acima. Os diferentes níveis de congelamento apresentados em resposta ao contexto, foram previamente associados ao choque nas patas (Gomes, Landeira-Fernandez, 2008). Os resultados parciais deste estudo indicaram que os animais CAC apresentaram um nível superior de postura de congelamento quando comparados com os animais CBC, CTR e Naive. A ANOVA mostrou que houve diferenças,

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

estatisticamente, significantes na porcentagem do tempo de congelamento ao longo dos seis minutos do teste. A comparação *post hoc* das médias dos grupos mostrou que os animais do grupo Naive apresentaram uma menor porcentagem de tempo em congelamento do que os animais dos grupos CAC, CBC e CTR ($P<0,001$).

Mecanismo pelo qual o conhecimento é retido, a memória pode ser dividida basicamente em curta e longa duração (Suzuki *et al.*, 2011). Em experiências aversivas, como um choque elétrico por exemplo, o contexto onde aconteceu o episódio contribui para a formação da memória emocional (medo) de longa duração. Tais experiências, induzem uma sequência de eventos moleculares em diversasas regiões cerebrais (Corcoran *et al.*, 2005). Essa cascata, culmina com a liberação de diferentes neurotransmissores, entre eles, o glutamato, que por sua vez, ativa os receptores sinápticos, tais como os NMDARs (Goosens, Maren, 2004). A abertura de canais de NMDA, causa despolarização da membrana, influxo de Ca^{2+} nas sinapses e ativação de quinases intracelulares, como a α-CaMKII (Ribeiro, Rodrigues, 2004). O aparente perfil aumentado destas proteínas nos animais CAC, corroboram com estudos que demonstram que os eventos sinápticos são seguidos de ativação de expressão gênica e síntese de proteínas, tão importantes para a formação de memórias emocionais de medo (Wilensky *et al.*,2000).

A isoforma alfa da CaMKII (α-CaMKII), em particular, tem sido apontada como um dos principais contribuintes tanto para o fortalecimento sináptico (Thiagarajan *et al.*, 2002) quanto para a aprendizagem associativa (Lisman *et al.,* 2002). O tecido cerebral é o local onde a quinase CaMKII mais altamente se expressa, quando comparada a outras regiões. Tem sido observado uma marcada variação de distribuição regional da isoforma α-CaMKII, sendo a mesma altamente concentrada no hipocampo. Tem sido demonstrado também, que a quinase CaMKII se mostra necessária para a aprendizagem dependente de hipocampo (Lisman *et al.*, 2002). Após a ativação, a CaMKII sofre translocação rápida para a densidade pós-sináptica (Strack *et al.,*1997). A CaMKII é muitas vezes chamada de "molécula da memória", porque a autofosforilação em um resíduo de treonina específico (Thr^{286}) permite que a enzima possa permanecer ativada após concentrações intracelulares de Ca^{2+} caírem a níveis basais (Lisman *et al.*, 2002). Na verdade, esta ativação persistente ocorre após o condicionamento do medo contextual (Atkins *et al.*, 1998) e estresse agudo (Bolla *et al.*, 2002) no hipocampo. Sendo assim, sugere-

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

se um papel fisiológico da α-CaMKII na formação de memória aversiva (medo) de longa duração (Collingridge *et al.,* 2013), bem como, em episódios de ansiedade.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

9
Referências Bibliográficas

ADAMS, F. et al. Acute oral dexamethasone administration reduces levels of orphan GPCR glucocorticoid-induced receptor (GIR) mRNA in rodent brain: potential role in HPA-axis function. **Molecular brain research**, v. 117, n. 1, p. 39–46, 2003. Acesso em: 4 dez. 2014.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science, 2002.

ALMEIDA-FILHO, N. et al. Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity. Methodological features and prevalence estimates. **The British Journal of Psychiatry**, v. 171, n. 6, p. 524–529, 1997. Acesso em: 4 dez. 2014.

ANHUAMAN, L. A. L. **Fatores comportamentais, hormonais e neuroanatômicos associados à vulnerabilidade ao estresse em ratos Carioca High Conditioned-Freezing (CHF) e Carioca Low Conditioned-Freezing (CLF)**. 2012. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59134/tde-03042014-174324/en.php>. Acesso em: 4 dez. 2014.

ANTUNES, G. **Modelo computacional dos mecanismos pós-sinápticos da potenciação sináptica de longa duração inicial NMDA-dependente em células piramidais hipocampais CA1**. 2007. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.livrosgratis.com.br/arquivos_livros/cp039033.pdf>. Acesso em: 4 dez. 2014.

ATKINS, C. M. et al. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. **Nature neuroscience**, 00906, v. 1, n. 7, p. 602–609, 1998. Acesso em: 4 dez. 2014.

BARCO, A.; LOPEZ DE ARMENTIA, M.; ALARCON, J. M. Synapse-specific stabilization of plasticity processes: the synaptic tagging and capture hypothesis revisited 10 years later. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 00044, v. 32, n. 4, p. 831–851, 2008. Acesso em: 27 nov. 2014.

BEAR, M. F.; COOPER, L. N. Molecular mechanisms for synaptic modification in the visaul cortex: interaction between theory and experiment. In: GLUCK, M. A.; RUMELHART, D. E. (Org.). **Neuroscience and connectionist theory**. Hillsdale: Lawrence Erlbaum, 1990. p. 65–94. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=TXt6ZVMSz8sC&oi=fnd&pg=PR3&dq=Neuroscience+and+Connectionist+Theory&ots=okxZpnqOu7&sig=Xk7kPQHv4P7klZXgmWzOfq73xSU>. Acesso em: 5 dez. 2014.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

BIGNAMI, G. Selection for high rates and low rates of avoidance conditioning in the rat. **Animal Behaviour**, v. 13, n. 2, p. 221–227, 1965. Acesso em: 5 dez. 2014.

BI, G.; POO, M. Synaptic modification by correlated activity: Hebb's postulate revisited. **Annual review of neuroscience**, 00890, v. 24, n. 1, p. 139–166, 2001. Acesso em: 5 dez. 2014.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual review of psychology**, v. 39, n. 1, p. 43–68, 1988. Acesso em: 5 dez. 2014.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Defensive reactions in the albino rat. **Learning and Motivation**, v. 2, n. 4, p. 351–362, 1971. Acesso em: 5 dez. 2014.

BLISS, T. V.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of physiology**, v. 232, n. 2, p. 331–356, 1973. Acesso em: 5 dez. 2014.

BOLLA, M. et al. Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): a phase III randomised trial. **The Lancet**, v. 360, n. 9327, p. 103–108, 2002. Acesso em: 27 nov. 2014.

BOLLES, R. C.; COLLIER, A. C. The effect of predictive cues on freezing in rats. **Animal Learning & Behavior**, v. 4, n. 1, p. 6–8, 1976. Acesso em: 5 dez. 2014.

BRANDÃO, M. L. et al. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. **Behavioural brain research**, v. 188, n. 1, p. 1–13, 2008. Acesso em: 27 nov. 2014.

BREMNER, J. D. The relationship between cognitive and brain changes in posttraumatic stress disorder. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1071, n. 1, p. 80–86, 2006. Acesso em: 5 dez. 2014.

BROADBENT, N. J.; SQUIRE, L. R.; CLARK, R. E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 40, p. 14515–14520, 2004. Acesso em: 5 dez. 2014.

BUCHANAN, T. W. et al. Circadian regulation of cortisol after hippocampal damage in humans. **Biological psychiatry**, v. 56, n. 9, p. 651–656, 2004. Acesso em: 5 dez. 2014.

CALDARONE, B. et al. Quantitative trait loci analysis affecting contextual conditioning in mice. **Nature genetics**, v. 17, n. 3, p. 335–337, 1997. Acesso em: 5 dez. 2014.

COHEN, N. J.; SQUIRE, L. R. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: Dissociation of knowing how and knowing that. **Science**, v. 210, n. 4466, p. 207–210, 1980. Acesso em: 5 dez. 2014.

COLBRAN, R. Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. **Biochem. J**, v. 378, p. 1–16, 2004. Acesso em: 5 dez. 2014.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

COLLINGRIDGE, G. L. Long term potentiation in the hippocampus: mechanisms of initiation and modulation by neurotransmitters. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 6, p. 407–411, 1985. Acesso em: 5 dez. 2014.

_____. et al. The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 13–26, 2013. Acesso em: 27 nov. 2014.

_____.; KEHL, S. J.; MCLENNAN, H. T. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. **The Journal of Physiology**, v. 334, n. 1, p. 33–46, 1983. Acesso em: 5 dez. 2014.

CORCORAN, K. A. et al. Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction. **The Journal of neuroscience**, v. 25, n. 39, p. 8978–8987, 2005. Acesso em: 27 nov. 2014.

DARWIN CHARLES, R. **On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life**. São Paulo: Companhia das Letras, 1859/2000.

DIAS, G. P. et al. Behavioral profile and dorsal hippocampal cells in carioca high-conditioned freezing rats. **Behavioural brain research**, v. 205, n. 2, p. 342–348, 2009. Acesso em: 27 nov. 2014.

DINELEY, K. T. et al. β-Amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal α7 nicotinic acetylcholine receptors: in vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 12, p. 4125–4133, 2001. Acesso em: 5 dez. 2014.

DOSEMECI, A. et al. Glutamate-induced transient modification of the postsynaptic density. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 18, p. 10428–10432, 2001. Acesso em: 27 nov. 2014.

EICHENBAUM, H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 109–120, 2004. Acesso em: 5 dez. 2014.

FANSELOW, M. S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. **The midbrain periaqueductal gray matter**. [S.l.]: Springer, 1991. p. 151–173. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-3302-3_10>. Acesso em: 5 dez. 2014.

_____.; DONG, H.-W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, 2010. Acesso em: 5 dez. 2014.

_____.; LESTER, L. S. A functional behavioristic approach to aversively motivated behavior: Predatory imminence as a determinant of the topography of defensive behavior. In: BOLLES, R. C.; BEECHER, M. D. (Org.). **Evolution and Learning**. Hillsdale: Lawrence Erlbaum, 1988. p. 185–212. Disponível em: <http://psycnet.apa.org/psycinfo/1987-98812-010>. Acesso em: 27 nov. 2014.

_____.; POULOS, A. M. The neuroscience of mammalian associative learning. **Annual Review of Psychology**, v. 56, p. 207–234, 2005. Acesso em: 27 nov. 2014.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

FERGUSON, R. E. et al. Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 566–571, 2005. Acesso em: 6 dez. 2014.

FERREIRA, A. B. H. **Novo dicionário Aurélio da língua portuguesa**. 15. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1992.

FIORAVANTI, A. C. M. et al. Avaliação da estrutura fatorial da escala de Ansiedade-Traço do IDATE. **Avaliação Psicológica**, v. 5, n. 2, p. 217–224, 2006. Acesso em: 5 dez. 2014.

GALVÃO, B. O. **Efeito da estimulação elétrica da mcpd em comportamentos de defesa: participação do córtex cingulado anterior rostral e nas linhagens carioca alto e baixo congelamento**. 2012. Tese de Doutorado – PUC-Rio - Departamento de Psicologia, Rio de Janeiro, 2012.

GARCIA-FALGUERAS, A. et al. Differential hippocampal neuron density between inbred Roman high-(low anxious) and low-avoidance (high anxious) rats. **Neuroscience letters**, v. 522, n. 1, p. 41–46, 2012. Acesso em: 5 dez. 2014.

GAZZANIGA, M. S.; HEATHERTON, T. F.; VERONESE, M. A. V. **Ciência psicológica: mente, cérebro e comportamento**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

GIORGI, O.; PIRAS, G.; CORDA, M. G. The psychogenetically selected Roman high-and low-avoidance rat lines: a model to study the individual vulnerability to drug addiction. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 1, p. 148–163, 2007. Acesso em: 28 nov. 2014.

GOELET, P. et al. The long and the short of long-term memory: A molecular framework. **Nature**, v. 322, p. 419–422, 1986. Acesso em: 27 nov. 2014.

GOMES, F. V. et al. Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT1A receptors. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 104–113, 1 jan. 2012. Acesso em: 5 dez. 2014.

GOMES, V. C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Amygdaloid lesions produced similar contextual fear conditioning disruption in the Carioca high- and low-conditioned freezing rats. **Brain Research**, v. 1233, p. 137–145, 2008. Acesso em: 5 dez. 2014.

GOOSENS, K. A.; MAREN, S. NMDA receptors are essential for the acquisition, but not expression, of conditional fear and associative spike firing in the lateral amygdala. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 537–548, 1 jul. 2004. Acesso em: 5 dez. 2014.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behavior and related emotions in mammals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 811–829, 1994.

GRAHAME, N. J. Selected lines and inbred strains: tools in the hunt for the genes involved in alcoholism. **Alcohol Research & Helth**, v. 24, n. 2, p. 159–163, 2000.

GRIFFITH, L. C. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: an unforgettable kinase. **The Journal of neuroscience**, v. 24, n. 39, p. 8391–8393, 2004. Acesso em: 6 dez. 2014.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

GRILLON, C.; DIERKER, L.; MERIKANGAS, K. R. Fear-potentiated startle in adolescent offspring of parents with anxiety disordersf. **Biological Psychiatry**, v. 44, n. 10, p. 990–997, 1998. Acesso em: 6 dez. 2014.

GUIMARÃES, R. **Dicionário da mitologia grega**. São Paulo: Cultrix, 1997.

HEBB, D. O. **The organization of behavior**. New York: Wiley, 1949/1968. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=uyV5AgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=The+organization+of+behavior&ots=mImZFqGSWv&sig=uAaqPdFJty6JgdpJoD1A3l7uadc>. Acesso em: 6 dez. 2014.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning and memory**, v. 68, n. 3, p. 285–316, 1997. Acesso em: 6 dez. 2014.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KIMURA, R.; SILVA, A. J.; OHNO, M. Autophosphorylation of αCaMKII is differentially involved in new learning and unlearning mechanisms of memory extinction. **Learning & Memory**, v. 15, n. 11, p. 837–843, 2008. Acesso em: 6 dez. 2014.

KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–475, 2005. Acesso em: 25 nov. 2014.

KRATCHMAROVA, I. et al. A proteomic approach for identification of secreted proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 3, p. 213–222, 2002. Acesso em: 27 nov. 2014.

KRÜGER, A.; LUCCHESI, P. M.; PARMA, A. E. Verotoxins in bovine and meat verotoxin-producing Escherichia coli isolates: type, number of variants, and relationship to cytotoxicity. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 1, p. 73–79, 2011. Acesso em: 27 nov. 2014.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Context and Pavlovian conditioning. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 2, p. 149–173, 1996. Acesso em: 6 dez. 2014.

_____.; CRUZ, A. P. M.; BRANDÃO, M. L. Padrões de respostas defensivas de congelamento associados a diferentes transtornos de ansiedade. **Psicologia USP**, v. 17, n. 4, p. 175–192, 2006. Acesso em: 6 dez. 2014.

LANDGRAF, R.; WIGGER, A. High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. **Behavior genetics**, v. 32, n. 5, p. 301–314, 2002. Acesso em: 6 dez. 2014.

LEDOUX, J. E. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? **Biological psychiatry**, v. 44, n. 12, p. 1229–1238, 1998. Acesso em: 6 dez. 2014.

_____. Emotional memory. **Scholarpedia**, v. 2, n. 7, p. 1806, 2007. Acesso em: 6 dez. 2014.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

_____. The amygdala and emotion: a view through fear. **The amygdala: a functional analysis**. New York: Oxford University Press, 2000. p. 289–310.

LENGYEL, I. et al. Autonomous activity of CaMKII is only transiently increased following the induction of long-term potentiation in the rat hippocampus. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 11, p. 3063–3072, 2004. Acesso em: 6 dez. 2014.

LISMAN, J. A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 23, p. 9574–9578, 1989. Acesso em: 6 dez. 2014.

_____.; ZHABOTINSKY, A. M. A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly. **Neuron**, v. 31, n. 2, p. 191–201, 2001. Acesso em: 6 dez. 2014.

_____.; SCHULMAN, H.; CLINE, H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 3, p. 175–190, 2002. Acesso em: 6 dez. 2014.

LORANGER, A. W. et al. The international personality disorder examination: The World Health Organization/Alcohol, Drug Abuse, and Mental Health Administration international pilot study of personality disorders. **Archives of General Psychiatry**, v. 51, n. 3, p. 215–224, 1994a. Acesso em: 27 nov. 2014.

LYNCH, G.; BAUDRY, M. The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 2, p. 375, 1990. Acesso em: 6 dez. 2014.

MALENKA, R. C. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. **Cell**, v. 78, n. 4, p. 535–538, 1994.

MAREN, S. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. **Trends in neurosciences**, v. 22, n. 12, p. 561–567, 1999. Acesso em: 27 nov. 2014.

_____. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annual review of neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 897–931, 2001. Acesso em: 6 dez. 2014.

MARTIN, S. J.; GRIMWOOD, P. D.; MORRIS, R. G. M. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. **Annual review of neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 649–711, 2000. Acesso em: 27 nov. 2014.

MARTINS, R. D. **O papel dos glicocorticóides no tratamento das patologias psiquiátricas de memória**. 2011. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011. Disponível em: <http://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/95178>. Acesso em: 6 dez. 2014.

MCEWEN, B. S. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. **Metabolism**, v. 54, n. 5, p. 20–23, 2005. Acesso em: 6 dez. 2014.

_____. Mood disorders and allostatic load. **Biological psychiatry**, v. 54, n. 3, p. 200–207, 2003. Acesso em: 27 nov. 2014.

_____. Stress and hippocampal plasticity. **Annual review of neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 105–122, 1999. Acesso em: 6 dez. 2014.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

_____. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain research**, v. 886, n. 1, p. 172–189, 2000. Acesso em: 27 nov. 2014.

MCGAUGH, J. L. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. **Trends in neurosciences**, v. 25, n. 9, p. 456–461, 2002. Acesso em: 6 dez. 2014.

MILLER, N. E.; WEISS, J. M. Effects of the somatic or visceral responses to punishment. **Punishment and aversive behavior. New York: Appleton-Century-Crofts**. New York: Appleton-Century-Crofts, 1969. p. 343–372.

MILNER, B.; SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron**, v. 20, n. 3, p. 445–468, 1998. Acesso em: 6 dez. 2014.

MISHKIN, M. Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. **Nature**, v. 273, n. 5660, p. 297–298, 1978. Acesso em: 27 nov. 2014.

MONCLARO, A. V. Controles de carregamento em Western Blot. **Materiais e Métodos**, 2013. Disponível em: <http://www.labome.com.br/method/Loading-Controls-for-Western-Blots.html>. Acesso em: 27 nov. 2014.

MORMÈDE, P. et al. Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, n. 5, p. 563–583, 2002. Acesso em: 6 dez. 2014.

MYERS, D. Introdução à psicologia geral. **Rio de Janeiro: LTC**, 00149, 1999.

OOMEN, C. A. et al. Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 12, p. 3395–3401, 2007. Acesso em: 6 dez. 2014.

OTMAKHOV, N. et al. Persistent accumulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dendritic spines after induction of NMDA receptor-dependent chemical long-term potentiation. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 42, p. 9324–9331, 2004. Acesso em: 26 nov. 2014.

PARÉ, D.; QUIRK, G. J.; LEDOUX, J. E. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. **Journal of neurophysiology**, v. 92, n. 1, p. 1–9, 2004. Acesso em: 6 dez. 2014.

PESSOTTI, I.; PESSOTTI, I. Conceito de loucura na Antigüidade. **I. Pessotti. A loucura e as épocas**, p. 12–51, 1994.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346–356, 1977. Acesso em: 6 dez. 2014.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. **Learning & Memory**, v. 1, n. 1, p. 34–44, 1994. Acesso em: 6 dez. 2014.

PROUDFOOT, H.; BAILLIE, A. J.; TEESSON, M. The structure of alcohol dependence in the community. **Drug and alcohol dependence**, v. 81, n. 1, p. 21–26, 2006. Acesso em: 6 dez. 2014.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

QUERVAIN, D. J. F. et al. Glucocorticoid-induced impairment of declarative memory retrieval is associated with reduced blood flow in the medial temporal lobe. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 6, p. 1296–1302, 2003. Acesso em: 25 nov. 2014.

RAMOS, A. et al. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. **Behavior Genetics**, v. 33, n. 6, p. 657–668, 2003. Acesso em: 6 dez. 2014.

RESSTEL, L. B. M. et al. Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray reduces the expression of contextual fear conditioning in rats. **Psychopharmacology**, v. 198, n. 3, p. 405–411, 2008. Acesso em: 6 dez. 2014.

RIBEIRO, J. L.; RODRIGUES, A. P. Questões acerca do coping: A propósito do estudo de adaptação do Brief Cope. **Psicologia, Saúde & Doenças**, v. 5, n. 1, p. 3–15, 2004. Acesso em: 6 dez. 2014.

RODRIGUES, S. M.; LEDOUX, J. E.; SAPOLSKY, R. M. The influence of stress hormones on fear circuitry. **Annual review of neuroscience**, v. 32, p. 289–313, 2009. Acesso em: 6 dez. 2014.

ROESLER, R.; QUEVEDO, J. Neuroquimica da memoria. **Rev. psiquiatr. clín.(Säo Paulo)**, v. 25, n. 4, p. 151–7, 1998. Acesso em: 6 dez. 2014.

ROGAN, M. T.; LEDOUX, J. E. Emotion: systems, cells, synaptic plasticity. **Cell**, v. 85, n. 4, p. 469–475, 1996. Acesso em: 6 dez. 2014.

ROSEN, J. B.; SCHULKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychological review**, v. 105, n. 2, p. 325, 1998. Acesso em: 6 dez. 2014.

SANDI, C. et al. Modulation of hippocampal NCAM polysialylation and spatial memory consolidation by fear conditioning. **Biological psychiatry**, v. 54, n. 6, p. 599–607, 2003. Acesso em: 6 dez. 2014.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions 1. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, 2000. Acesso em: 6 dez. 2014.

SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 11, 1957. Acesso em: 6 dez. 2014.

SELYE, H. **Stress in health and disease**. Boston: Butterworths, 1976. Disponível em: <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/329773>. Acesso em: 27 nov. 2014.

SILVA, A. V.; CAVALHEIRO, E. A. Epilepsia: uma janela para o cérebro. **Revista Multiciência**, n. 3, 2004. Disponível em: <http://www.multiciencia.rei.unicamp.br/artigos_03/a_05_.pdf>. Acesso em: 6 dez. 2014.

SKELDING, K. A.; ROSTAS, J. A.; VERRILLS, N. M. Controlling the cell cycle: the role of calcium/calmodulin-stimulated protein kinases I and II. **Cell Cycle**, v. 10, n. 4, p. 631–639, 2011. Acesso em: 6 dez. 2014.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychological review**, v. 99, n. 2, p. 195, 1992. Acesso em: 6 dez. 2014.

_____.; KANDEL, E. R. **Memória: da mente às moléculas**. Porto Alegre: Digitrad, 2003.

_____.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 24, p. 13515–13522, 1996. Acesso em: 6 dez. 2014.

STEIMER, T.; DRISCOLL, P. Inter-individual vs line/strain differences in psychogenetically selected Roman High-(RHA) and Low-(RLA) Avoidance rats: neuroendocrine and behavioural aspects. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 1, p. 99–112, 2005. Acesso em: 6 dez. 2014.

STRACK, S. et al. Differential Inactivation of Postsynaptic Density-Associated and Soluble Ca2+/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II by Protein Phosphatases 1 and 2A. **Journal of neurochemistry**, v. 68, n. 5, p. 2119–2128, 1997. Acesso em: 6 dez. 2014.

SUZUKI, A. et al. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 810–823, 2011. Acesso em: 6 dez. 2014.

THIAGARAJAN, T. C.; PIEDRAS-RENTERIA, E. S.; TSIEN, R. W. α-and βCaMKII: inverse regulation by neuronal activity and opposing effects on synaptic strength. **Neuron**, v. 36, n. 6, p. 1103–1114, 2002. Acesso em: 6 dez. 2014.

VEST, R. S. et al. Dual mechanism of a natural CaMKII inhibitor. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 12, p. 5024–5033, 2007. Acesso em: 27 nov. 2014.

WANG, H. et al. CaMKII activation state underlies synaptic labile phase of LTP and short-term memory formation. **Current Biology**, v. 18, n. 20, p. 1546–1554, 2008. Acesso em: 6 dez. 2014.

WANG, S.H.; REDONDO, R. L.; MORRIS, R. G. Relevance of synaptic tagging and capture to the persistence of long-term potentiation and everyday spatial memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 45, p. 19537–19542, 2010. Acesso em: 6 dez. 2014.

WAYMAN, G. A. et al. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. **Neuron**, v. 59, n. 6, p. 914–931, 2008. Acesso em: 6 dez. 2014.

WILENSKY, A. E.; SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E. The amygdala modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 18, p. 7059–7066, 2000. Acesso em: 6 dez. 2014.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1211192/CA