

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THIAGO RODRIGUES DA SILVA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE TAMOXIFENO NA RECONSOLIDAÇÃO
DA MEMÓRIA AVERSIVA NO CONDICIONAMENTO DO MEDO
CONTEXTUAL EM RATOS**

CURITIBA
2016

THIAGO RODRIGUES DA SILVA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE TAMOXIFENO NA RECONSOLIDAÇÃO
DA MEMÓRIA AVERSIVA NO CONDICIONAMENTO DO MEDO
CONTEXTUAL EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, no Programa de Pós- Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Cristina A.J. Stern

CURITIBA
2016

*Dedico este trabalho a minha querida Mãe que intensamente lutou pela vida,
minha inspiração, meu bem maior.. “Saudade sem fim!”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e o cuidado em cada momento da minha existência, também por ter me proporcionado sabedoria nos momentos de dificuldade.

Ao professor Dr. Roberto Andreatini, que me abriu a porta desta oportunidade, pelos ensinamentos e os momentos dispensados na orientação deste trabalho.

A professora Dra. Cristina Jack Stern, pela co-orientação prestada, pelos ensinamentos e pela imensa dedicação a este trabalho.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC Dr. Leandro José Bertoglio e Dr. Reinaldo Takahashi, pelas sugestões para este trabalho.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFPR, Dra. Maria Vital e Dra. Eunice Andre que avaliaram o meu exame de qualificação de mestrado e contribuíram com suas sugestões para o término desse trabalho.

A todos os professores, funcionários e colaboradores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFPR, que contribuíram para a minha formação científica e no desenvolvimento deste trabalho.

A professora Dra. Irinéia Baretta por me incentivar a seguir a carreira acadêmica.

A minhas colegas do laboratório de Farmacologia do Sistema Nervoso Central Camila e Luiza, pelo companheirismo no dia-dia e contribuição ao trabalho.

Ao colega do laboratório de Toxicologia Reprodutiva Jonas Goulart por ter auxiliado nos procedimentos realizados com as fêmeas.

A minha família e amigos pelo companheirismo, incentivo e confiança depositada em todos os momentos.

A minha amada Mãe, "Te amarei eternamente"..

Aos bancas, professora Dra. Janaina Zanoveli e professor Dr. Bruno Martynhak, pela contribuição e disponibilidade em avaliar este trabalho.

À Capes, pelo apoio financeiro.

Enfim, todos que de alguma maneira contribuíram para que este sonho se tornasse realidade. Obrigado!

“Em muitas áreas da vida, vencer significa não precisar competir

com ninguém para ser feliz.”

Thiago Grulha

Resumo

A recuperação da memória pode torná-la lábil transformando-a vulnerável a interrupções uma vez que este evento é seguido por uma fase de estabilização. Estudos mostram que esta vulnerabilidade é reduzida ao longo do tempo, como ocorre na consolidação. A proteína quinase C (PKC), e a sua isoforma específica do cérebro PKM ζ parece ser essenciais para a manutenção da potenciação a longo prazo e a persistência da memória ao longo do tempo. O tamoxifeno (TMX) é um inibidor não-selectivo da PKC utilizado no tratamento clínico de câncer de mama e episódios maníacos do transtorno bipolar. O presente estudo avaliou o efeito da administração sistêmica de TMX (1, 10 ou 50 mg / kg) imediatamente, 6, 9 e 12 horas após a reativação da memória em ratos submetidos ao condicionamento do medo contextual. Os animais foram familiarizados no Contexto A durante 3 minutos, após 24 horas a sessão de condicionamento ao medo contextual (0,6 mA, 3 s, 30 s de intervalo entre os choques), recuperação de memórias (3 min), Teste A₁ e teste A₂, 3 min no contexto A, 24 horas e 7 dias após a recuperação da memória, respectivamente. Um contexto neutro (Contexto B) foi usado para evitar a recuperação da memória. A memória do medo foi mensurada a partir da percentagem do comportamento de congelamento. Os animais tratados com TMX (50 mg / kg), não mostrou nenhuma mudança no comportamento de congelamento durante o ensaio A₁, mas apresentou menos tempo de congelamento do que os controles durante Teste A₂, sugerindo que as manipulações farmacológicas durante a fase de reconsolidação podem prejudicar a persistência da memória. Não houve diferença quando os animais foram expostos ao teste B. O efeito induzido TMX é dependente de recuperação da memória. O efeito de TMX prejudica a memória a longo prazo em animais que foram expostos ao contexto A 23 dias após o condicionamento do medo contextual. Considerando que TMX é um modulador de estrogênio, também testamos o seu efeito em fêmeas. O TMX prejudicou a persistência da memória aversiva semelhante ao observado nos ratos machos. No entanto, este efeito, só foi observado em fêmeas na fase não-estro do ciclo estral. As fêmeas na fase-estro do ciclo estral não eram suscetíveis ao prejuízo na persistência da memória. O presente trabalho proporciona a evidência de que TMX atenua a persistência da memória do medo de uma maneira duradoura e pode ser usado como uma potencial estratégia terapêutica em transtornos mentais como o TEPT.

Palavras-Chave: Reconsolidação da memória. Memória de medo. PKC. Tamoxifeno.

Abstract

The retrieval of memory may render it labile turning it vulnerable to disruptions since this event is followed by a stabilization phase. Studies show that this vulnerability is reduced over time as occurs in the consolidation. The kinase C (PKC) protein, and its specific isoform of PKM ζ brain appears to be essential for the maintenance of long-term potentiation and memory persistence over time. Tamoxifen (TMX) is a non-selective inhibitor of PKC used in the clinical treatment of breast cancer and manic episodes of bipolar disorder. This study evaluated the systemic administration of the effect of TMX (1, 10 or 50 mg / kg) immediately, 6, 9 and 12 hours after the reactivation of memory in rats submitted to the contextual fear conditioning. The animals were familiarized in Context for 3 minutes, after 24 hours conditioning session the contextual fear (0.6 mA, 3 s, 30 s interval between shocks), memory retrieval (3 min) Test A1 and A2 test 3 min in the context a, 24 hours and 7 days after the retrieval from memory, respectively. A neutral environment (context B) was used to prevent the retrieval of memory. The fear memory was measured as percentage of freezing behavior. The animals treated with TMX (50mg / kg) showed no change in freezing behavior during the test A1, but showed less freezing time than controls during Test A2, suggesting that pharmacological manipulation during reconsolidation phase can undermine the persistence of memory. No difference was observed when the animals were exposed in test B. The TMX effect is dependent on memory retrieval. The TMX effect impairs the long-term memory in animals that were exposed to context A 23 days after contextual fear conditioning. Considering TMX is an estrogen modulator, also tested the effect in females. The TMX detracted the persistence of aversive memory similar to that observed in male rats. However, this effect was only seen in females in non-estrus fase of estrous cycle. Females in estrus phase of estrous cycle were not susceptible to damage in the persistence of memory. This study provides evidence that TMX attenuates the persistent memory of fear of a lasting way and can be used as a potential therapeutic strategy in mental disorders such as PTSD.

Keywords: Memory reconsolidation. Fear memory. PKC. Tamoxifen.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	(A) Sessão de Familiarização.....	23
	(B) Sessão de Condicionamento.....	23
FIGURA 2-	Sessão de Evocação.....	23
FIGURA 3-	(A) Teste A.....	24
	(B) Teste B.....	24
FIGURA 4-	Efeito da administração do TMX imediatamente após a reativação da memória do medo contextual em ratos	27
FIGURA 5-	Efeito do TMX sobre a consolidação da memória.....	28
FIGURA 6-	Tratamento com TMX tardio prejudica a persistência da memória	30
FIGURA 7-	Efeito tardio do TMX depende da reativação/labilização da memória.....	33
FIGURA 8-	Efeito do TMX sobre a persistência da memória de medo é de longa duração.....	35
FIGURA 9-	Administração do TMX tardio prejudica a persistência da memória em fêmeas.....	37

ABREVIATURAS

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

Kg: Quilograma

LTP: Potenciação de longa duração (do inglês long term potentiation)

LVGCC_S: Canal de cálcio dependente de voltagem do tipo-L

mA: miliampere

MDZ: Midazolam

Mg: Miligrama

ml: Mililitro

min: Minuto

mRNA: RNA mensageiro

NDP: Nimodipino

PKC: Proteína quinase C

PKM β : Isoforma da proteína quinase C

s: Segundo

TEPT: Transtorno de Estresse Pós-Traumático

TMX: Tamoxifeno

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Hipótese	19
3. Justificativa.....	19
4. Objetivo.....	20
4.1 Objetivos específicos.....	20
5. Materiais e Métodos.....	21
5.1 Animais.....	21
5.2 Drogas.....	21
5.3 Aparatos.....	21
5.4 Procedimentos experimentais.....	22
5.5 Análise estatística.....	25
6. Resultados	26
6.1 Experimento 1. Administração do tamoxifeno durante a reconsolidação prejudica a persistência da memória.....	26
6.2 Experimento 2. Tratamento tardio com tamoxifeno prejudica a persistência da memória.....	28
6.3 Experimento 3. Efeito tardio do tamoxifeno depende de reativação/reconsolidação da memória.....	31
6.4 Experimento 4. O efeito do tamoxifeno sobre a persistência da memória de medo é de longa duração.....	34
6.5 Experimento 5: Administração tamoxifeno 6 h após a reativação prejudica a persistência da memória em fêmeas.....	35
7. Discussão	38
8. Conclusão.....	42
9. Referências.....	43

1. Introdução

A memória é um evento fisiológico capaz de gerar o armazenamento de novas informações e fatos que são fundamentais para vida humana. O aprendizado é um processo no qual novos conhecimentos são adquiridos após o indivíduo passar por experiências, sendo esses novos conhecimentos são capazes de gerar modificações cerebrais que podem persistir por um longo período de tempo. A memória possui uma grande importância para o desenvolvimento natural dos indivíduos, e está envolvida no desenvolvimento de novas idéias, no recebimento de instruções, realização de tarefas, na resolução de problemas cotidianos, e em situações onde o indivíduo necessita tomar decisões.

A memória também pode ser caracterizada pelas mudanças de comportamento dos indivíduos por consequência de suas experiências obtidas previamente. Desse modo, a memória está envolvida com a personalidade humana e as conexões interpessoais, além de ter grande importância na psiquiatria por participar de transtornos cognitivos e emocionais. Com isso é importante ressaltar que a formação, bem como sua evocação, a atualização e o seu uso das memórias produzem um impacto importante na vida do indivíduo como também na saúde mental (ALBERINI & LEDOUX, 2013).

Classicamente as memórias apresentam algumas etapas no processo de formação: aquisição, consolidação, recuperação, reconsolidação e persistência. Dentre os vários tipos de memória, podemos ressaltar a memória aversiva, que é relevante em transtornos relacionados ao medo. Há diversos tipos de memória e diferentes estruturas do cérebro desempenham o seu papel específico.

A etapa da aquisição da memória acontece quando o indivíduo passa por uma experiência que é capaz de gerar um aprendizado. Informações primárias são levadas ao cérebro através de órgãos sensoriais e células nervosas que transmitem as informações sensoriais até as estruturas cerebrais correspondentes.

Após o processo de aquisição a memória passa pela fase de consolidação. Inicialmente a memória recém-adquirida se encontra em um estado lábil, susceptível a interferências, por um curto período de tempo e logo essa memória é levada a um estágio estável, podendo ser armazenada em longo prazo (NADER et al., 2000).

Alguns circuitos neuronais específicos são ativados durante o processo de formação da memória e sofrem modificações e alterações plásticas que permanecem em longo prazo. Tal armazenamento refere a informações relacionadas à experiência primária. Essas modificações requerem o envolvimento complexo e temporalmente orquestrado de estruturas cerebrais, sistemas transmissores e cascatas celulares específicas (MCGAUGH, 2000).

Dentre os mecanismos moleculares da consolidação da memória está a potenciação de longa duração (LTP), mecanismo celular que inicialmente descrito por Donald Hebb em 1949. Este mecanismo necessita a modificação persistente de sinapses que são ativadas através dos receptores glutamatérgicas do tipo NMDA. Com a ativação dos receptores NMDA, ocorre um aumento do influxo de cálcio para dentro do neurônio, recrutando cascatas intracelulares de proteínas, como por exemplo o das proteínas kinases A e C (COLLEY, SHEU & ROUTTENBERG, 1990) e induzindo a síntese de outras proteínas, como o BDNF e Arc, que em conjunto, irão gerar um remodelamento sináptico (MCGAUGH, 2000). Conseqüentemente, ocorre um aumento da superfície sináptica e da densidade de receptores na membrana. Somadas, essas mudanças geram uma alteração sustentada das sinapses, caracterizando a LTP (DUDAI, 2004). Este processo ocorre dentro de um período que é de aproximadamente seis horas a partir do momento em que as informações chegam as estruturas cerebrais (NADER et al., 2000). Após a memória ser consolidada ela pode ser utilizada, e assim, a memória é reativada através dos circuitos neuronais envolvidos em sua formação.

O fenômeno de reconsolidação começou a ser proposto por Przybylski & Sara em seu trabalho publicado em 1997, onde demonstraram que um antagonista do receptor de glutamato do tipo NMDA prejudica a memória espacial de ratos no labirinto radial de oito braços. Quando uma memória é reativada pela breve exposição a um componente do evento (p.ex.

contexto no medo condicionado ao contexto), momento em que a memória entra em uma nova fase de consolidação, a memória volta a ser lábil por um período de tempo e posteriormente ela é reconsolidada. Neste período de labilidade, a memória pode ser influenciada pelo tratamento farmacológico (BONINI et al., 2007; PARSONS & RESSLER, 2013; STERN et al., 2013). Portanto, intervenções farmacológicas nestes momentos de reconsolidação podem ser úteis no tratamento do Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT), um transtorno com importantes alterações de memória (PARSONS & RESSLER, 2013; STERN et al., 2013). Nesta linha, observou-se que a administração imediatamente após a reativação da memória de drogas benzodiazepínicas (p.ex. midazolam), do canabidiol e do propranolol prejudica a reconsolidação, reduzindo o comportamento de imobilidade nas re-exposições ao contexto (DEBIEC & LEDOUX, 2004; STERN et al., 2012), um indicativo de redução da memória aversiva. Estudos recentes têm explorado os mecanismos de reconsolidação com bases nas semelhanças com a fase de consolidação (GAZARINI et al., 2014). Para que ocorra a reconsolidação é necessário que novas proteínas sejam sintetizadas para que a memória possa ser novamente estabilizada. O período em que ocorre a reconsolidação é de aproximadamente 6 (seis) horas (GAZARINI et al., 2013; DE LA FUENTE et al., 2015). É importante ressaltar que a duração da re-exposição é uma variável crítica para induzir reconsolidação sendo necessário que esta exposição ao componente do evento seja breve, pois quanto a sessão de re-exposição é prolongada leva a memória a sua extinção. A extinção gera um novo aprendizado formando um novo traço de memória a partir de uma longa exposição, e quando o indivíduo é exposto a algum componente do evento o traço da memória original e o traço da memória da extinção (recém adquirido) levam a uma competição entre estes dois traços.

Interferências na memória tem surgido como potenciais oportunidades terapêuticas para alterar memórias que estão relacionadas com transtornos psiquiátricos, como por exemplo o TEPT (PARSONS & RESSLER, 2013). A reconsolidação é considerada o principal mecanismo de atualizar e manter as memórias a longo prazo, e tem se mostrado como um grande potencial terapêutico para modificar memórias indesejadas, já que na clínica a evocação

e recuperação pode ser desencadeada em circunstâncias controladas. Na fase de consolidação a memória também apresenta um estado lábil suscetível a interferências, porém não apresenta uma oportunidade terapêutica, pois seria necessário a intervenção logo após ocorrer o trauma (DE OLIVEIRA et al., 2013).

A memória ao ser consolidada pode permanecer ao longo da vida do indivíduo, e estudos recentes têm demonstrado em alguns paradigmas a persistência da memória. Após a consolidação da memória, uma onda tardia de síntese de proteínas é necessária para sustentar e armazenar a memória a longo prazo, sendo que este período consiste em uma janela temporal de aproximadamente 24 horas (KATCHE et al., 2010). Bekinschtein et al., em 2007 demonstrou que a inibição da síntese de proteínas 12 horas após aquisição prejudica a memória espacial de ratos. Semelhantemente a inibição de C-FOS ou a expressão do RNAm no hipocampo prejudica a persistência da memória de longo prazo, sem prejudicar a memória per se (KATCHE et al., 2010). Recentemente Nakayama et al, (2013), demonstrou que a inibição da síntese de proteínas na amígdala basolateral de camundongos 9,5 h após a recuperação da memória no medo condicionado ao contexto, atenua a persistência da memória reativada, propondo que uma nova síntese de proteínas é necessária para a manutenção da memória após a recuperação. Adicionalmente, demonstrou que a expressão de Arc que também é conhecida como Arg 3.1, na amígdala basolateral, está envolvida na persistência de memórias de medo recém adquiridas e reativadas (NAKAYAMA et al, 2016).

A proteína quinase C (PKC) é uma família de isoenzimas que participa da mediação da sinalização intraneuronal e que apresenta em comum uma ativação dependente de cálcio e fosfolipídios. A PKC é encontrada em grande quantidade no cérebro, estando associada a regulação da excitabilidade neuronal, da liberação de neurotransmissores, da expressão gênica e da plasticidade sináptica (NISHIZUKA, 1988). A ativação de PKC pode aumentar a liberação de neurotransmissores pelo aumento da atividade dos canais de Ca^{2+} , pela inibição dos canais de K^+ , por alterações na exocitose, pelo aumento no *pool* de vesículas ou pelo aumento da sensibilidade ao Ca^{2+} (GIORDANO et.al., 2005; JUNG et.al., 2005). Esse grupo de enzimas desempenha um

papel importante na atividade de receptores monoaminérgicos (α_1 , 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}), colinérgicos (M₁, M₃ e M₅), para vasopressina e substância P. A PKC tem sido associada a uma série de transtornos psiquiátricos, como na mania (STECKERT et al., 2012; ARMANI et al., 2014) Bonini et al., (2007) demonstram que a PKC e suas isoformas são importantes para a memória espacial, quando também verificou-se que a atividade da PKC é necessária na região CA1 do hipocampo dorsal de rato para aquisição e consolidação da memória espacial no labirinto aquático Morris.

Uma nova quinase, uma isoforma da PKC denominada PKM ζ , tem sido demonstrada essencial para a manutenção de alguns tipos de memória. Uma quinase constitutivamente ativa PKM ζ encontra-se aumentada no citosol durante o estágio de manutenção da memória de longo prazo (SACKTOR et al., 2012). Inibindo as propriedades catalíticas desta quinase pode-se alterar memórias bem estabelecidas, modificando a persistência da memória de longo prazo (GLANZMAN, 2013). O peptídeo inibitório zeta (ZIP) é capaz de prejudicar a memória de longo prazo na esquiwa ativa, e a inibição da PKM ζ no hipocampo dorsal e na amígdala basolateral (BLA) prejudica a persistência de memórias adquiridas no labirinto radial, no labirinto aquático de Morris, na esquiwa inibitória, e no medo contextual (SERRANO et al 2008).

O Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) é um transtorno de ansiedade associado à vivência de um evento de grande estresse ou testemunha pessoal de evento traumático ocorrido com outras pessoas, como por exemplo: agressão física, violência sexual, seqüestro, ser mantido refém, ataque terrorista, tortura, encarceramento como prisioneiro de guerra, desastres naturais, acidentes automobilísticos graves, entre outros. O TEPT é caracterizado por lembranças intrusivas (p.ex. *flashbacks*, sonhos, etc.), sensação de recorrência do estresse, intenso desconforto frente a estímulos que lembrem o evento, hipervigilância, entorpecimento emocional, entre outros sinais e sintomas (JANICAK et al., 2006). O TEPT acarreta elevada morbidade e relevante repercussão nas atividades sociais, profissionais e familiares dos pacientes, apresentando uma prevalência de 9% (JANICAK et al., 2006). Segundo o Manual Diagnostico e Estatístico de Transtornos Mentais (5ª edição, DSM-V) o TEPT pode ocorrer em qualquer idade a partir do primeiro

ano de vida. Os sintomas geralmente se manifestam dentro dos primeiros três meses depois do trauma, embora possa haver um atraso de meses, ou até anos, antes de os critérios para o diagnóstico serem atendidos. Fatores pré-traumáticos podem contribuir com o desenvolvimento do transtorno como, problemas emocionais na infância, transtornos mentais prévios (p. ex., transtorno de pânico, transtorno depressivo), *status* socioeconômico baixo; grau de instrução inferior; exposição anterior a trauma (especialmente durante a infância), adversidades na infância (p. ex., privação econômica, disfunção familiar, separação ou morte dos pais); assim como fatores genéticos e fisiológicos incluindo o gênero feminino e idade mais jovem no momento da exposição ao trauma (para adultos).

O tratamento do TEPT é baseado na administração de fármacos antidepressivos com atividade serotoninérgica (p.ex. sertralina), que apresentam eficácia relativa, mas que possuem vários efeitos adversos como distúrbios gastrointestinais, aumento da ansiedade no início do tratamento, disfunção sexual, entre outros (JANICAK et al., 2006). Portanto, novas abordagens farmacológicas são necessárias no tratamento do TEPT.

Como descrito anteriormente, drogas inibidoras da PKC parecem reduzir a memória, interferindo nos processos de aquisição, consolidação e reconsolidação (BONINI et al., 2007). O tamoxifeno (TMX), um fármaco modulador do receptor estrogênico utilizado no tratamento do câncer de mama, apresenta efeito inibidor não seletivo da PKC e têm se mostrado efetivo no episódio maníaco (YILDIZ et al., 2011) e em modelos animais (EINAT et al., 2007; SABIONI et al., 2008; ARMANI et al., 2014; PEREIRA et al., 2014).

Uma das primeiras etapas na pesquisa de novos psicofármacos é a sua avaliação em modelos animais com validade preditiva para fármacos. Dentre os diversos paradigmas experimentais utilizados para estudar memórias aversivas, o condicionamento Pavloviano (PAVLOV, 1927) encontra-se em destaque devido a sua grande utilidade, simplicidade e valor translacional, uma vez que também pode ser utilizado em seres humanos (PHELPS & LEDOUX, 2005). Nesse paradigma, os indivíduos associam um estímulo sensorial prévio neutro (estímulo condicionado: EC; luz, som, odor ou contexto) com um estímulo aversivo coincidente, usualmente um choque (estímulo

incondicionado: EI). A partir de então, uma memória associativa é formada e a re-exposição subsequente ao EC gera no animal a expressão de comportamentos de defesa (fuga, congelamento, esquiva), reações autonômicas (hipertensão e taquicardia) e endócrinas (elevação dos níveis de corticosterona e recrutamento de outros sistemas neuro-hormonais (LEDOUX, 2000). Na re-exposição ao contexto repetidamente o comportamento que vai reduzindo gradativamente, caracterizando o processo de extinção (BITTENCOURT et al., 2008; NINOMYA et al., 2010).

Drogas potencialmente efetivas no TEPT reduzem a imobilidade nas re-exposições quando comparadas ao controle. Por exemplo, a espirolactona, antagonista dos receptores mineralocorticóides, WIN 55212-2, agonista dos receptores canabinóides, AM404, inibidor do metabolismo e captação de endocanabinóides, reduzem a imobilidade nas re-exposições ao contexto (BITTENCOURT et al., 2008; NINOMYA et al., 2010).

2. Hipótese:

Considerando que a PKC (e suas isoformas) é uma importante proteína para a cascata proteica responsável pela neurobiologia da memória, a hipótese do presente trabalho é que drogas que inibem a PKC, prejudicam a reconsolidação e a persistência da memória de medo ao contexto. Deste modo esta classe de drogas poderia ser utilizada como um possível tratamento do TEPT.

3. Justificativa

Considerando as atuais limitações do tratamento do TEPT, o principal fármaco testado no presente estudo foi o tamoxifeno (TMX), pois é um medicamento já em uso clínico, que apresenta boa penetração no sistema nervoso central e eficácia clínica em outros transtornos psiquiátricos, consistindo em um fármaco viável para testes clínicos. Portanto, no caso de resultados favoráveis do TMX em estudos pré-clínicos, o caminho para os testes clínicos seria abreviado.

4 Objetivo:

Portanto, o objetivo geral deste projeto foi avaliar o potencial terapêutico da administração de TMX no TEPT quando administrado na reconsolidação da memória traumática, utilizando o medo condicionado ao contexto como modelo animal.

4.1 Objetivos específicos:

- Realizar a curva dose-resposta do efeito do TMX sobre a reconsolidação da memória;
- Avaliar o efeito do TMX após 6, 9 e 12 horas após a reconsolidação da memória;
- Avaliar o efeito do TMX após a consolidação da memória;
- Avaliar o efeito do TMX na memória aversiva em animais não-reativados;
- Avaliar se o efeito do TMX persiste ao longo do tempo em memórias aversivas;
- Avaliar se o efeito do TMX necessita da labilização após reativação da memória aversiva;
- Avaliar o efeito do TMX em fêmeas em diferentes fases do ciclo estral;

5. Materiais e métodos:

5.1 Animais

Os animais utilizados foram ratos Wistar machos e fêmeas (3 meses) com peso em torno de 250 a 300 gramas, provenientes do biotério do setor de Ciências Biológicas da UFPR, foram mantidos em caixas plásticas (60 X 25 X 25 cm), grade padrão, 5 animais por caixa, sob temperatura controlada (22 ± 3 °C), ciclo claro/escuro de 12:12 (luzes acesas às 7h e apagadas às 19h) e água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados após aprovação do protocolo experimental pelo Comitê de Ética de Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas sob o numero 856.

5.2 Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: o Tamoxifeno (Sigma, EUA) foi administrado nas doses de 1,0, 10,0 e 50,0 mg/kg por via intraperitoneal, a droga foi dissolvida em 5% de monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80) e solução salina (EINAT et al., 2007; STECKERT et al., 2012; ABRIAL et al., 2013). O Midazolam (Cristália, Brasil) foi administrado na dose de 1,5 mg/kg por via intraperitoneal (STERN et al., 2012) utilizado como controle positivo, sendo diluído em solução salina e o nimodipino um bloqueador de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo (LGVCC), em administração intraperitoneal, dissolvido em 5% de monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80) e solução salina, em volume constante de 1ml/1Kg.(CRESTANI et al., 2015)

5.3 Aparatos

A sessão de condicionamento de medo contextual foi realizada em uma caixa chamada de Contexto A (26 x 31,5 x 21 cm; Insight, Brasil) feita de paredes laterais de alumínio, com a parede frontal e a tampa superior em acrílico. O chão é constituído por barras de aço inoxidável (3 mm de diâmetro e

espaçamento 0,9 mm de intervalo) ligado a um gerador de choque (Insight, Brasil). Uma caixa neutra chamada de Contexto B (34 x 26 x 33 cm) com paredes de acrílico transparente e uma tampa preta para fornecer pistas contextuais diferentes do contexto A. Contexto B foi utilizado para avaliar se o comportamento de medo observado no contexto condicionado é levado a um novo ambiente (fenômeno de generalização) sendo um contexto incapaz de induzir a reativação da memória do medo.

5.4 Procedimentos Experimentais

Todos os procedimentos experimentais foram planejados com intuito de minimizar o número de animais utilizados, seguindo normas internacionais de cuidado e manuseio de animais de experimentação científica. Cada bloco de experimentos foi realizado no mesmo período do dia, entre 12h00min e 17h00min horas para minimizar as variações comportamentais circadianas dos roedores. Todos os animais foram ambientados ao experimentador e à sala de experimento por pelo menos 30 min antes de cada sessão experimental. As salas de experimentação foram mantidas com temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade de 78 lux durante o experimento.

Primeiramente os animais foram submetidos a sessão de familiarização onde foram colocados na caixa chamada contexto A por 3 minutos (Figura 1), após a familiarização os animais foram colocados novamente na caixa moradia e após 24 horas foram submetidos a sessão de condicionamento. No dia do condicionamento os animais foram colocados na caixa de condicionamento e, em seguida receberam 3 choques (0,6mA, 3 s) nas patas, com o intervalo 30 segundos. Após o último choque, o rato permaneceu por mais 30s na caixa, sendo depois retirado, retornando a sua caixa moradia.

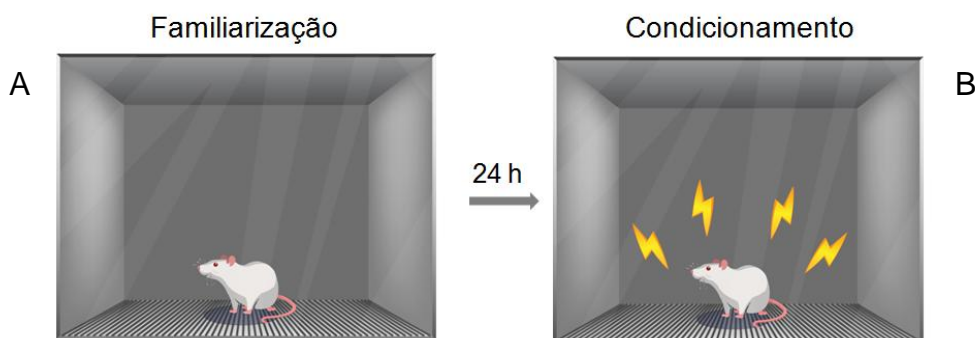


Figura 1: (A) Sessão de familiarização: consiste na exposição dos animais ao Contexto A num período de 3 minutos sem a presença do estímulo condicionado. (B) Sessão de condicionamento: a sessão de condicionamento foi realizada 24 horas após a familiarização e consistiu da exposição dos animais ao Contexto A, onde os animais receberam 3 choques na intensidade de 0,6 mA, o tempo em que o animal recebeu cada choque foi de 3 segundos

Na sessão de evocação e reativação do medo condicionado ao contexto (Figura 2) os ratos foram expostos por 3 min à caixa de condicionamento (contexto A), sem a presença do choque, sendo registrado o tempo de congelamento (caracterizado pela ausência completa de movimentos, exceto aqueles necessários para respiração). Imediatamente após a sessão de reativação, grupos independentes receberam veículo (Vei), TMX (1,0, 10,0 ou 50 mg/kg ip), midazolam (1,5 mg/kg ip)

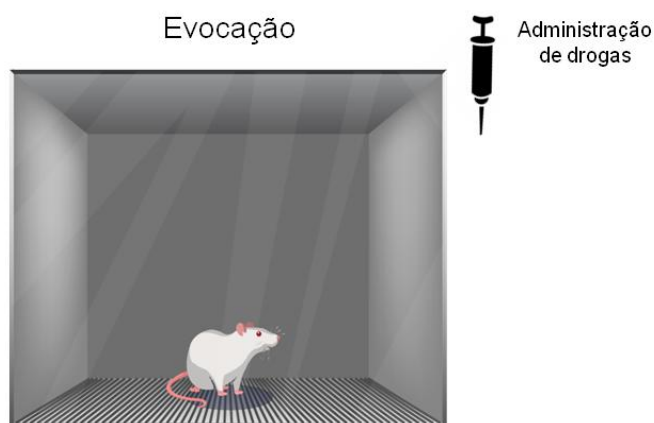


Figura 2: Sessão de evocação: a sessão de evocação da memória foi realizada 24 horas após a sessão de condicionamento, com exceção do experimento 3 onde os animais foram expostos ao contexto B (contexto neutro) deste modo a memória não foi reativada. A sessão de evocação é caracterizada por uma breve exposição de 3 minutos ao Contexto A, sem a presença de choque.

Após 1 ou 7 dias após a evocação os animais foram expostos a teste A (contexto A durante 3 min.) para avaliarmos o efeito farmacológico das drogas

utilizadas (Figura 3A), sendo denominado Teste A₁ um dia após a evocação e Teste A₂, 7 dias mais tarde. Vinte e quatro horas após os testes A₁ e A₂, os ratos foram expostos ao contexto B (Teste B) por 3min, para avaliar se o comportamento observado no contexto condicionado é generalizado (Figura 3B).

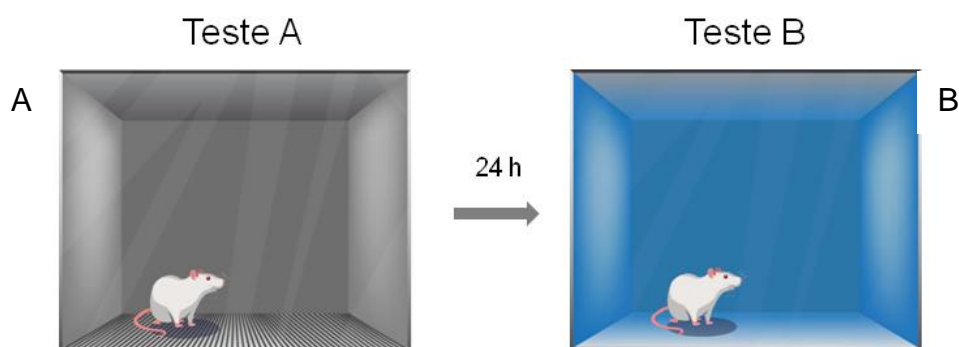


Figura 3: (A) Teste A: o Teste A foi realizado 24 horas após a sessão de evocação no experimento 1, no experimento 2 o Teste A foi realizado 18, 15 ou 12 horas após a evocação. Em todos os experimentos os animais foram reexpostos ao Teste A, denominada de Teste A2. O Teste A consistiu da exposição dos animais no Contexto A, na ausência do choque, por 3 minutos para avaliação do comportamento de congelamento. Nos experimentos 3, o Teste A ocorreu 24 horas após a exposição dos animais ao Contexto B. (B) Teste B: o Teste B correu 24 horas após o Teste A em todos os experimentos e consistiu da exposição dos animais ao Contexto B por 3 minutos. O comportamento de congelamento foi avaliado.

Para avaliarmos se o efeito produzido pelo TMX necessita da reativação da memória de medo, no experimento 3A, após 24 horas a sessão de condicionamento os animais foram expostos ao contexto B durante 3 min, desta maneira os animais não tiveram a memória de medo evocada e reativada. Também avaliamos se o efeito do TMX dependia da labilização da memória de medo e para isso no experimento 3B os animais receberam nimodipino 30 min. antes da sessão de evocação/reativação. Deste modo o minodipino sendo um bloqueador dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, impede o influxo de cálcio para dentro do terminal nervoso, impedindo a desestabilização da cascata proteica (CRESTANI, et al., 2015; SUZUKI, et al., 2008).

No experimento 4, avaliamos se o TMX pode induzir uma perturbação persistente da memória do medo através da reconsolidação ao longo do tempo, e portanto os animais foram re-expostos a teste A₃ e B₃ após 23 dias a sessão de evocação.

No experimento 5 foram utilizadas fêmeas para avaliar diferenças de gênero no efeito do TMX, considerando que o TMX é também um modulador dos receptores de estrogênio. Durante o período experimental, todas as manhãs às 8h00m as fêmeas foram levadas para a sala experimental para avaliação do ciclo estral. A secreção vaginal foi coletada com uma micropipeta com 50 mL de solução salina (NaCl 0,9%), por meio da inserção da ponteira da micropipeta na vagina das fêmeas, mas não profundamente. O fluido vaginal foi colocado sobre uma lâminas de vidro, sendo utilizado uma lamina diferente para cada fêmea avaliada. O material foi observado sob um microscópio de luz, sem o uso de lentes do condensador, 10 e 40 x em lente objetiva. Característica na aparência citológica dos esfregaços foram utilizados para identificar a fase do ciclo e para estabelecer que as fêmeas estavam ciclando normalmente (MARCONDES et al., 2002).

As câmaras foram limpas com uma solução de etanol / água a 10% depois de cada sessão. Após cada sessão experimental os animais foram realocados em suas caixas moradias e retornaram ao ratário do departamento de farmacologia.

5.5 Análise Estatística

O tempo de congelamento foi transformado em porcentagem do tempo total da sessão ($\% = \text{tempo de congelamento} \times 100 / 180$) e foi expresso com média e erro padrão da média. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas: fatores tratamento e sessão (medida repetida) caso preencham pressupostos de normalidade e homocedasticidade. No caso resultados significantes, foi utilizada ANOVA de uma via (para medidas repetidas ou não, conforme o caso) seguida de teste de Newman-Keuls. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6. Resultados

6.1 Experimento 1. Administração do tamoxifeno durante a reconsolidação prejudica a persistência da memória.

Para investigar o efeito do tamoxifeno na reconsolidação da memória do medo contextual, ratos condicionados ao Contexto A foram distribuídos aleatoriamente em grupos ($n = 7-12$ / grupo) que receberam veículo ou tamoxifeno (TMX; 1, 10 ou 50 mg / kg) i.p. imediatamente após a reativação da memória. O midazolam (MDZ; 1,5 mg / kg) i.p. foi usado como controle positivo. Medidas repetidas ANOVA mostraram uma interação entre tratamento e Contexto re-exposição [$F(8,76) = 4,03$; $P = 0,0005$]. Como mostrado na Figura 5, todos os grupos apresentaram níveis semelhantes de congelamento durante a reativação. Como esperado, durante o Teste A_1 e teste A_2 o grupo tratado com MDZ apresentou menos tempo de congelamento do que os controles devido ao seu efeito prejudicial na reconsolidação da memória de medo. No entanto, nos animais tratados com TMX não foi observada nenhuma mudança durante o ensaio A_1 . No entanto, durante o teste A_2 , os animais que foram tratados com TMX (50 mg / kg) apresentaram comportamento de congelamento menor do que os controles e em relação a eles mesmos no teste A_1 , sugerindo que as manipulações farmacológicas durante a fase de reconsolidação especificamente podem prejudicar a persistência da memória. Medidas repetidas ANOVA também não mostraram diferenças durante exposições ao Contexto B não pareado [$F(4,37) = 1,58$; $P = 0,20$], sugerindo nenhum condicionamento ou generalização induzida pelo tratamento.

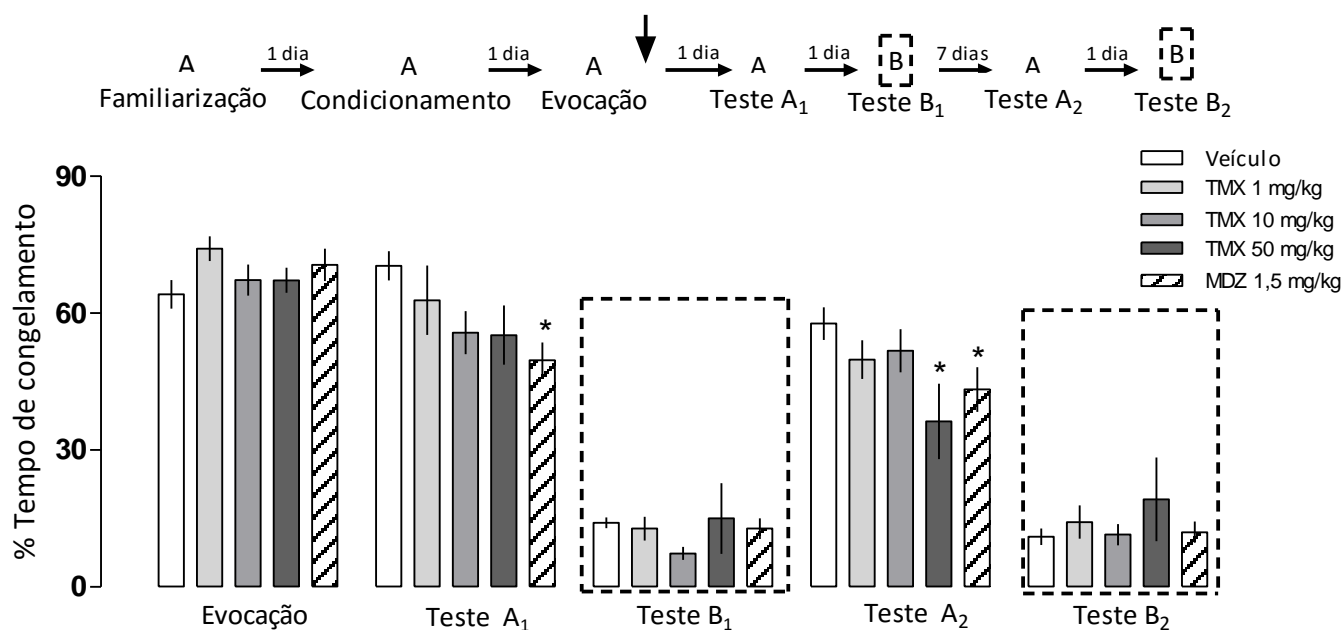


Figura 4: Efeito da administração (i.p.) do tamoxifeno (TMX; 1, 10 ou 50 mg / kg) imediatamente após a reativação de memória de medo contextual em ratos. O midazolam (MDZ; 1,5 mg / kg) i.p. foi utilizado como controle positivo ($n = 7-12$ / grupo). Todos os grupos apresentaram níveis semelhantes de congelamento durante a reativação. Durante o teste A₁ e teste A₂ o grupo tratado com MDZ apresentou menor tempo de congelamento do que os controles devido ao seu efeito na reconsolidação da memória. Os animais tratados com TMX (50 mg / kg), apresentaram um comportamento de congelamento menor do que os controles apenas durante o teste A₂ sugerindo uma interferência específica na persistência da memória. O esquema acima do gráfico representa o delineamento experimental adotado. A seta indica o momento da administração do fármaco. As barras representam a percentagem de tempo total de congelamento. Os valores são expressos como média \pm SEM. *Diferença significativa ($P < 0,05$) comparado ao respectivo grupo controle.

Para avaliar o efeito do TMX sobre a consolidação da memória, os ratos foram distribuídos aleatoriamente em grupos ($n = 9-11$ / grupo) que receberam veículo ou da dose eficaz de TMX (50 mg / kg) i.p. imediatamente após a sessão de treino. ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo na interação entre tratamento medicamentoso e exposições para o Contexto emparelhado A [$F(1,18) = 10,0$; $P = 0,005$]. Como mostrado na Figura 5, o grupo tratado com TMX não mostrou nenhuma mudança no comportamento de congelamento durante o ensaio A₁, mas apresentou menos tempo de congelamento do que os controles durante Teste A₂, sugerindo que o TMX prejudica especificamente a persistência da memória. Durante as exposições ao contexto B, não foram observadas alterações [$F(1,18) = 0,13$; $P = 0,72$].

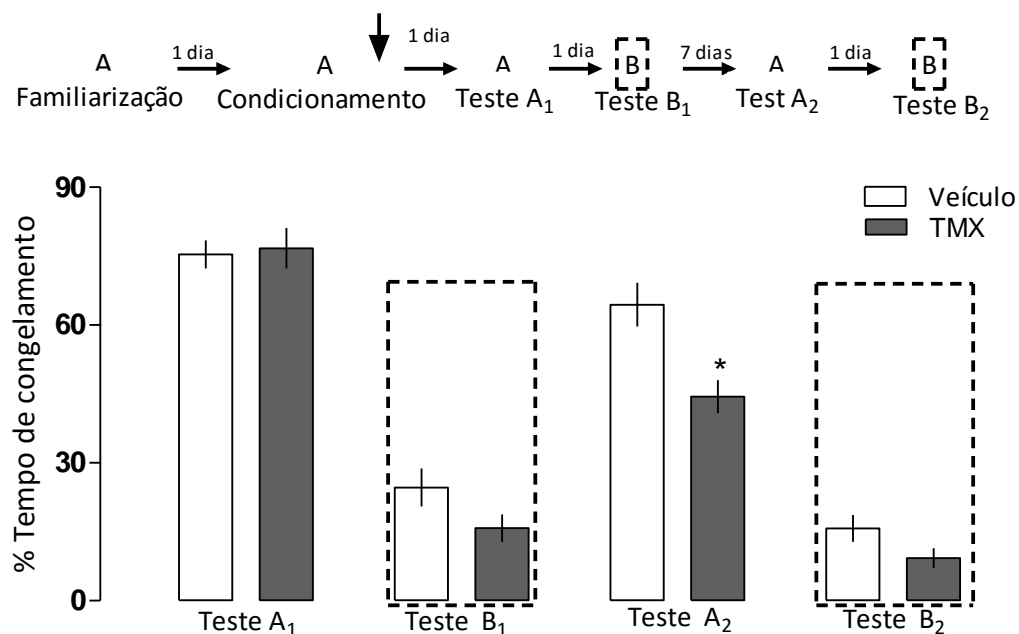


Figura 5: Efeito do TMX (50 mg / kg) sobre a consolidação da memória (n = 9-11 / grupo). O grupo tratado com TMX não demonstrou nenhuma diferença no comportamento de congelamento durante o teste A₁, mas apresentou menor tempo de congelamento do que os controles durante o teste A₂, sugerindo que TMX prejudica especificamente a persistência da memória. O esquema acima do gráfico representa o delineamento experimental adotado. A seta indica o momento da administração do fármaco. As barras representam a percentagem de tempo total de congelamento. Os valores são expressos como média ± SEM. *Diferença significativa (P < 0,05) comparado ao respectivo grupo controle.

6.2 Experimento 2. Tratamento tardio com tamoxifeno prejudica a persistência da memória

Eventos moleculares induzidos após a consolidação de um novo aprendizado (até 12 horas) pode ter impacto sobre a persistência da memória, em 7- 14 dias sem modificar sua expressão 2 dias pós-formação, ou seja, sem prejudicar a formação da memória em si (BEKINSCHTEIN et al., 2010). Se os resultados anteriores sugerem que um evento molecular final ocorre mesmo depois de reconsolidação, seria de esperar que a administração TMX tardio prejudicasse também a persistência da memória do medo. Na tentativa de investigar esta questão, grupos independentes de ratos condicionados ao Contexto A receberam veículo ou TMX (50mg / kg) 6, 9 ou 12 horas após a

reativação da memória. ANOVA de duas vias mostrou uma interação significativa entre tratamento medicamentoso e a re-exposição ao Contexto A quando o tratamento foi dado 6 [F (2,30) = 3,59; P = 0,04], ou 9 horas [F (2,26) = 4,10; P = 0,03] após a reativação da memória, mas não 12 horas depois [F (2,16) = 0,74; P = 0,50]. Todos os grupos apresentaram níveis de congelamento semelhantes durante a sessão de reativação e teste A₁, independente do tempo de tratamento, sugerindo que a memória de longo prazo pós-reativação estava intacta. No entanto, como mostrado na Figura 6A - B, animais tratados com a TMX (50 mg / kg), 6 ou 9 horas após a reativação da memória apresentaram menor comportamento de congelamento do que os controles durante o ensaio A₂, sugerindo uma interferência específica na persistência da memória. Nenhuma diferença foi encontrada quando TMX (50 mg / kg) foi administrado após 12 horas (Tabela 1). Além disso não foi observada generalização quando os diferentes grupos foram expostos ao Teste B [6 horas: F (1,15) = 2,71; P = 0,12; 9 horas: F (1,13) = 0,09; P = 0,76; 12 horas: F (1,8) = 1,75; P = 0,22].

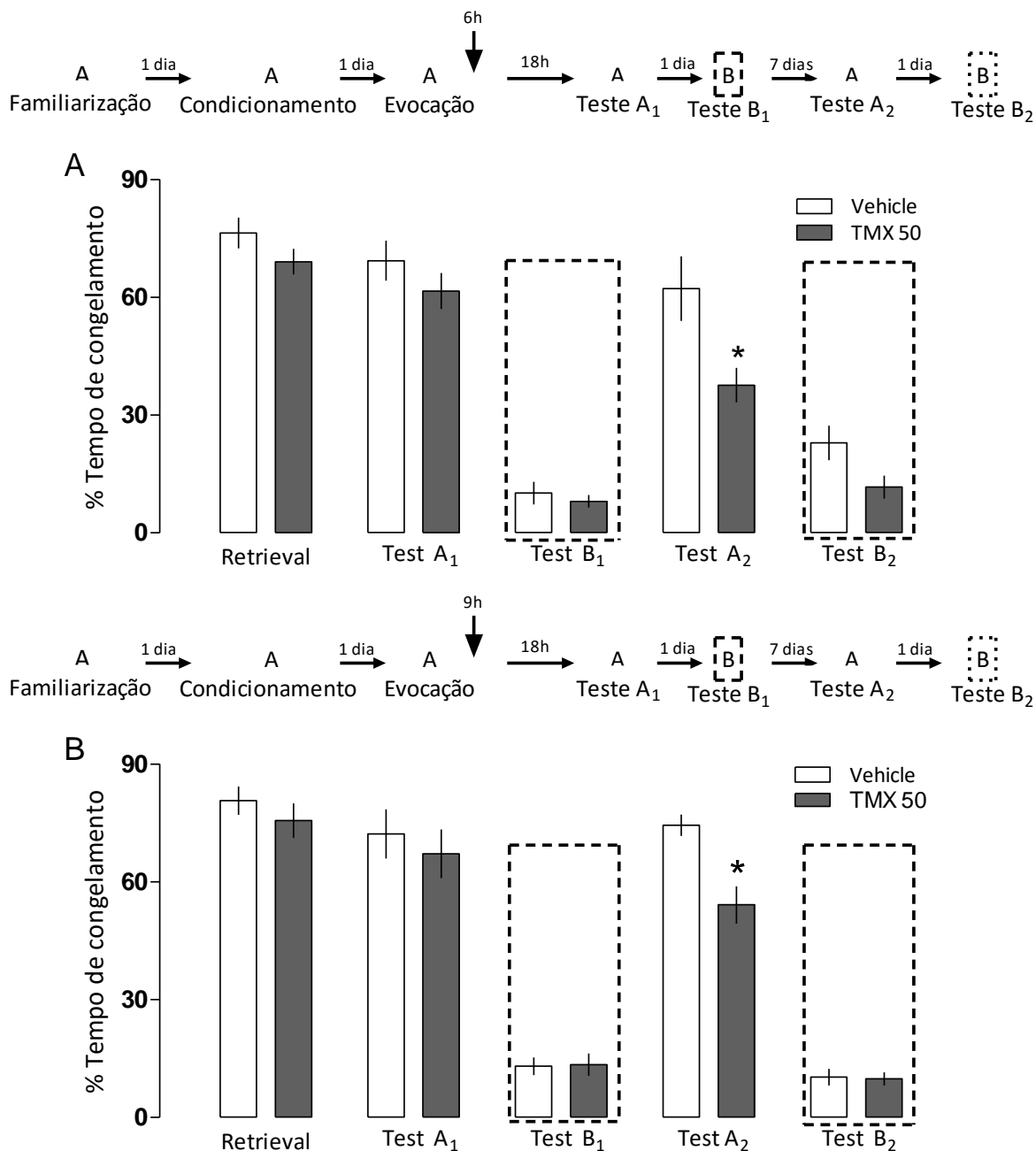


Figura 6: Tratamento com tamoxifeno tardio prejudica a persistência da memória. Nossos resultados anteriores sugerem que ocorre um evento molecular tardio depois da reconsolidação. TMX (50 mg / kg) foi administrado 6 (Figura 6A) ou 9 horas (Figura 6B) após a reativação da memória. Os resultados mostraram uma interação significativa entre tratamento medicamentoso e re-exposição a Contexto A quando o tratamento foi dado 6 ou 9 horas após a reativação da memória. Todos os grupos apresentaram níveis de congelamento semelhantes durante a sessão de reativação e o teste A₁, independente do tempo do ponto do tratamento, sugerindo que a memória de longo prazo pós-reativação estava intacta. Os animais tratados com TMX (50 mg / kg) 6 ou 9 horas após a reativação da memória apresentaram menor comportamento de congelamento do que os controles durante o teste A₂, sugerindo uma interferência específica na persistência da memória. Além disso, não foi observada a generalização quando os diferentes grupos foram expostos ao teste B₁ e teste B₂. O esquema acima do gráfico representa o delineamento experimental adotado. A seta indica o momento da administração do fármaco. As barras representam a percentagem de tempo total de congelamento. Os valores são expressos como média ± SEM. *Diferença significativa (P < 0,05) do grupo de controle respectivo (VEH).

Tabela 1: O tratamento tardio com tamoxifeno afeta a persistência da memória.

Evocação/Teste	Tratamento (12H)	
	Veículo	TMX
Evocação	74.30±4.87	72.77±5.96
Teste A ₁	73.47±3.67	67.00±4.34
Teste B ₁	15.69±1.22	14.33±4.15
Teste A ₂	65.83±4.13	55.22±9.30
Teste B ₂	19.30±2.30	8.55±5.12

Os resultados anteriores sugerem que o evento molecular ocorre mais tarde, após reconsolidação. No entanto TMX foi administrado (50 mg / kg) 12 horas após a reativação da memória. Os resultados não mostraram uma interação significativa entre tratamento medicamentoso e a reexposição ao contexto A. Todos os grupos tinham níveis semelhantes de congelamento durante a sessão de reativação, teste A₁ e teste A₂. Nenhuma diferença foi encontrada quando TMX (50 mg / kg) foi administrado após 12 horas. Além disso a generalização não foi observada quando diferentes grupos de teste foram expostas ao teste B₁ e teste B₂.

6.3 Experimento 3. Efeito tardio do tamoxifeno depende de reativação/reconsolidação da memória

Para investigar se o efeito induzido por TMX tardio é dependente de recuperação da memória, ratos condicionados a Contexto A foram alocados aleatoriamente em diferentes grupos (n = 7-8 / grupo) e receberam veículo ou TMX (50 mg / kg), 6 horas após a sua exposição ao Contexto B. ANOVA de duas vias não mostrou efeito significativo do tratamento [$F(1,13) = 0,00024$; $P = 0,99$] ou da re-exposições ao contexto A [$F(1,13) = 0,99$; $P = 0,34$]. Como mostrado na Figura 7A, não foram observadas alterações no comportamento de congelamento entre o grupo controle e tratado com TMX durante Teste A₂. Além disso, não foram observadas diferenças durante exposições no teste B [$F(1,13) = 0,79$; $P = 0,39$].

A recuperação nem sempre leva à reativação e a reconsolidação (GIACHERO et al., 2013). De acordo com a Suzuki et al. (2008), a ativação do canal de cálcio dependente de voltagem do tipo-L (LVGCC) é importante para a reativação/labilização da memória. Para avaliar ainda se os efeitos posteriores induzidos pelo TMX depende da reativação da memória, os ratos condicionados ao Contexto A (n = 10-11 / grupo) receberam nimodipino (16 mg / kg) i.p. 30 minutos antes da sessão de reativação e, 6 horas após a reativação, receberam veículo ou TMX (50 mg / kg) i.p. ANOVA de duas vias não mostrou efeito significativo do tratamento [$F(1,13) = 0,00024$; $P = 0,99$] ou

na re-exposição ao contexto A [$F(1,13) = 0,99$; $P = 0,34$]. Tal como mostrado na Figura 7B, não foram observadas diferenças no comportamento de congelamento entre o grupo controle e o tratado com TMX, durante o teste A_2 , confirmando que o efeito induzido por TMX depende reativação da memória de medo. Durante o teste B_1 e o teste B_2 não foram encontradas diferenças [$F(1,13) = 0,51$; $P = 0,50$]. Em conjunto, esses resultados confirmam que o final dos eventos que são alvo do tratamento com TMX são acionados pela reconsolidação da memória.

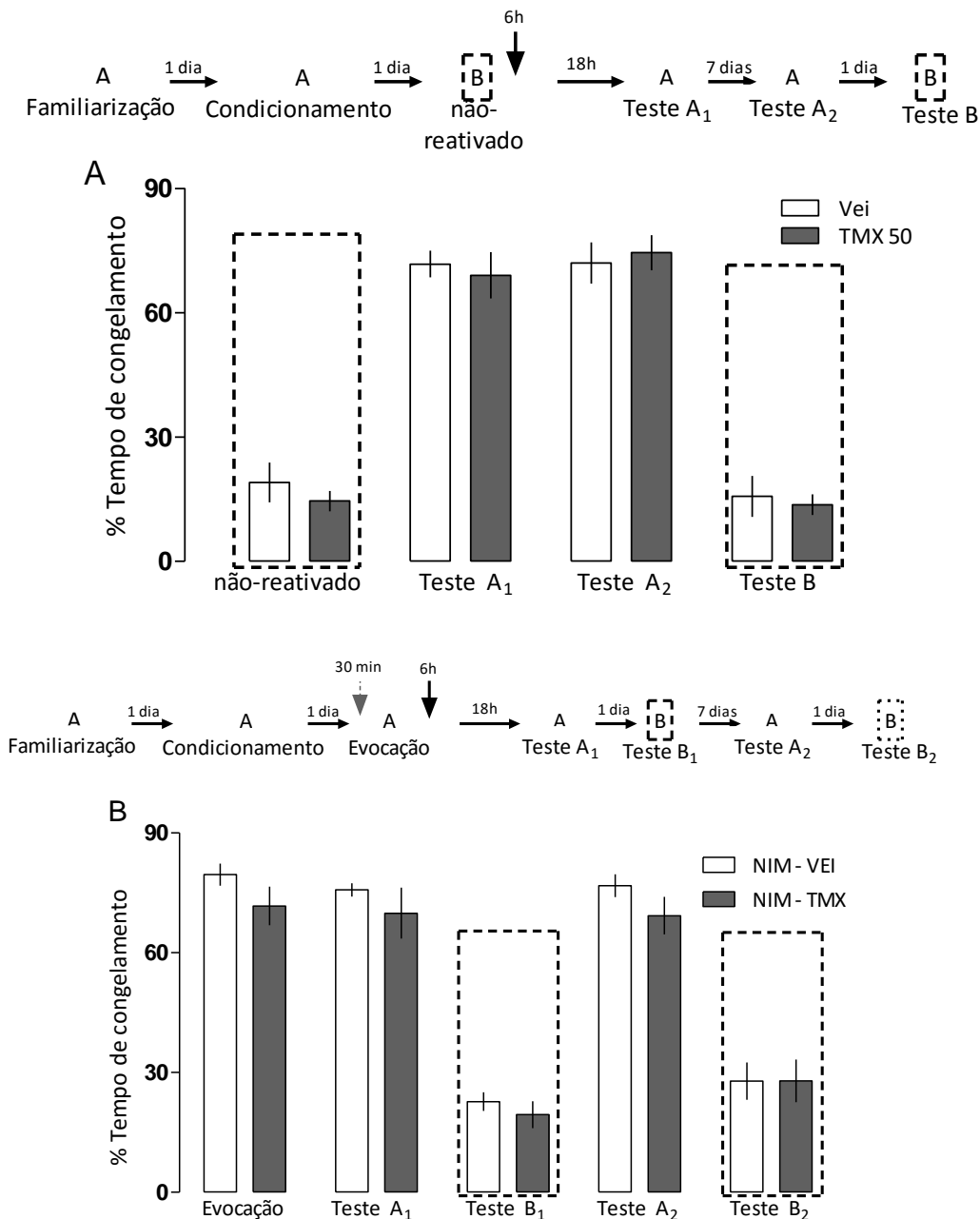


Figura 7. (A) Efeito induzido pelo TMX é dependente de recuperação da memória, os ratos receberam veículo ou TMX (50 mg / kg), 6 horas após a sua exposição ao contexto neutro (Contexto B). ANOVA de duas vias mostrou nenhum efeito significativo do tratamento. Não foram observadas mudanças no comportamento de congelamento entre o grupo controle e o grupo tratado com TMX durante teste A₂. Além disso, não foram observadas diferenças durante exposições ao teste B. (B) A ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (LVGCC) é importante para a reativação/labilização da memória. Os ratos 30 minutos antes da sessão de reativação da memória ao Contexto A (n = 10-11 / grupo) receberam nimodipina (16 mg / kg) i.p., e após 6 horas depois reativação receberam veículo ou TMX (50 mg / kg) i.p. Os resultados não mostraram nenhum efeito significativo do tratamento na re-exposição ao Contexto A. Não foram observadas diferenças no comportamento de congelamento entre o grupo e controle e o grupo tratado com TMX durante teste A₂, teste B₁ e teste B₂. Ao todo, os resultados confirmam que o final dos eventos que são alvo de tratamento com TMX é dependente de reconsolidação da memória. O esquema acima do gráfico representa o delineamento experimental adotado. A seta indica o momento da administração do fármaco. As barras representam a percentagem de tempo total de congelamento. Os valores são expressos como média ± SEM. *Diferença significativa (P <0,05) do grupo de controlo respectivo.

6.4 Experimento 4. O efeito do tamoxifeno sobre a persistência da memória de medo é de longa duração

Para investigar se o efeito posterior induzido por TMX é de longa duração, os ratos condicionados ao contexto A foram distribuídos aleatoriamente em grupos (n = 7-9 / grupo) que receberam veículo ou TMX (50 mg / kg), 6 horas após a reativação da memória de medo e testados após 7 e 21 dias. ANOVA de duas vias mostrou uma interação entre o tratamento e reexposição ao contexto A emparelhado [$F(3,42) = 4,10$; $P = 0,01$]. Como mostrado na Figura 8, todos os grupos apresentaram níveis semelhantes do comportamento de congelamento durante a reativação e Teste A₁. Confirmando os resultados anteriores, durante o teste A₂ o grupo tratado com TMX apresentou menor comportamento de congelamento do que os controles. Este efeito permaneceu pelo menos até o 21º dia, quando os animais foram reexpostos ao teste A₃. ANOVA de duas vias mostrou um efeito da droga durante a exposição ao Teste B [$F(1,14) = 11,73$; $P = 0,004$]. Como mostrado na Figura 9, durante a exposição ao grupo tratado com TMX no Teste B₃ apresentou menor comportamento de congelamento do que os controles, sugerindo que o tratamento com TMX atenuou o comportamento de generalização que pode ser desenvolvido ao longo do tempo.

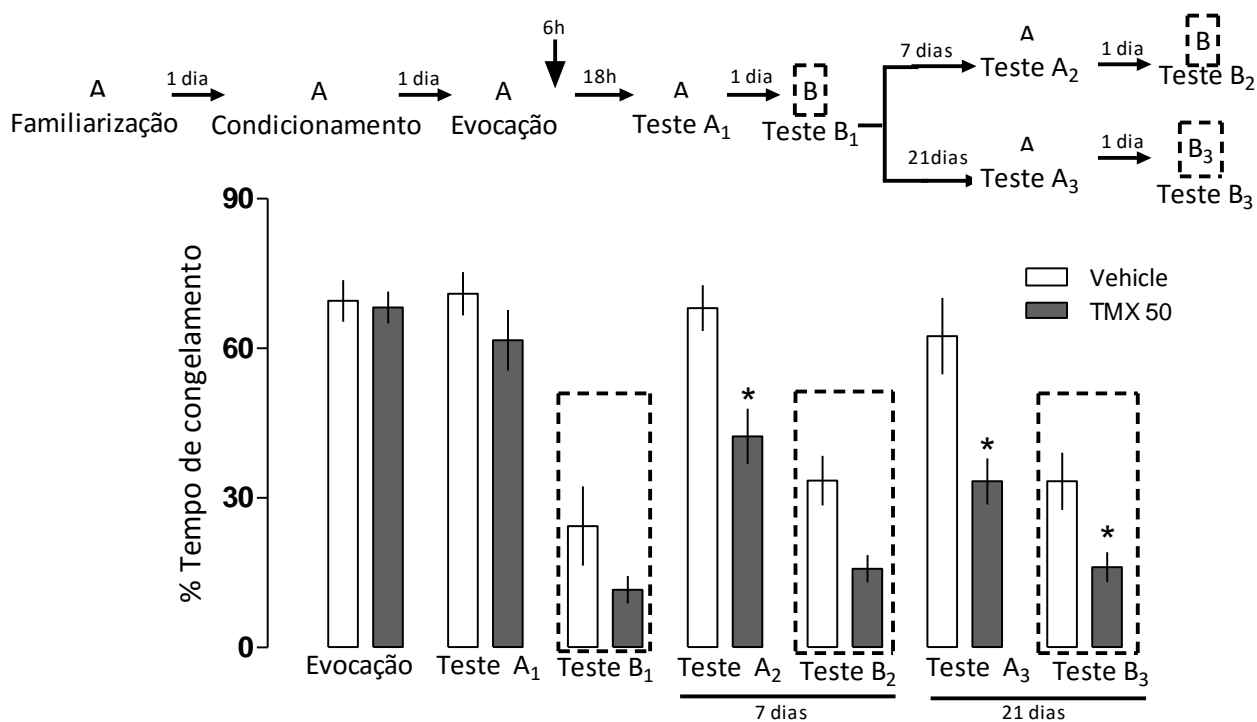


Figura 8. Efeito do tamoxifeno (TMX 50 mg / kg) na memória do medo persiste ao longo de 21 dias. Os animais foram condicionados ao contexto A e receberam veículo ou TMX 6 horas após a reativação da memória do medo. Todos os grupos apresentaram níveis semelhantes de congelamento durante a reativação e teste A₁. Durante o teste A₂ e teste A₃ o grupo tratado com TMX apresentou um menor comportamento de congelamento do que os controles. Quando re-exposto ao teste B₃, o grupo tratado com TMX apresentou menor comportamento de congelamento do que os controles. O esquema acima do gráfico representa o delineamento experimental adotado. A seta indica o momento da administração do fármaco. As barras representam a percentagem de tempo total de congelamento. Os valores são expressos como média \pm SEM. *Diferença significativa ($P < 0,05$) do grupo de controle respectivo.

6.5 Experimento 5: Administração de tamoxifeno 6 h após a reativação prejudica a persistência da memória em fêmeas

Considerando que o TMX apresenta também atividade modulatória sobre os receptores de estrogênio, para investigar se a efeito tardio induzido pelo TMX sobre a persistência a memória medo é específica do gênero, fêmeas foram condicionadas a contexto A e distribuídas aleatoriamente em grupos ($n = 9 - 8$ / grupo), que receberam veículo ou TMX (50 mg / kg) 6 horas após a reativação da memória. ANOVA de duas vias mostrou uma interação entre tratamento medicamentoso e re-exposição ao contexto A [$F(2,30) = 14,70$; $P = 0,00004$] em fêmeas que não estavam na fase de estro do ciclo estral. Estas fases do ciclo estral foram agrupadas, pois apresentaram o mesmo padrão de resposta quando analisadas separadamente (dados não

mostrados) Como mostrado na Figura 9A, o comportamento de congelamento continua a ser o mesmo, durante a reativação e o teste A₁. No entanto, durante a exposição ao teste A₂, grupo tratado apresentou menos TMX comportamento de congelamento do que os controles, reproduzindo em fêmeas os resultados anteriores observados em macho. Durante o teste B não foi encontrada diferença [F (1,15) = 0,03; P = 0,87]. No entanto, quando o mesmo experimento foi realizado com fêmeas na fase estro do ciclo estral, que foram alocados aleatoriamente em grupos (n = 6-8 / grupo) que receberam veículo ou TMX (50 mg / kg) 6 horas após a reativação da memória. ANOVA de duas vias mostrou que não existe efeito significativo durante exposições ao contexto A [F (2,24) = 0,08; P = 0,92]. Como mostrado na Figura 9B, não foram encontradas diferenças entre os grupos durante o ensaio teste A₁ e teste A₂. Também não foram encontradas diferenças durante a exposição ao contexto B [F (1,12) = 0,09; P = 0,76]

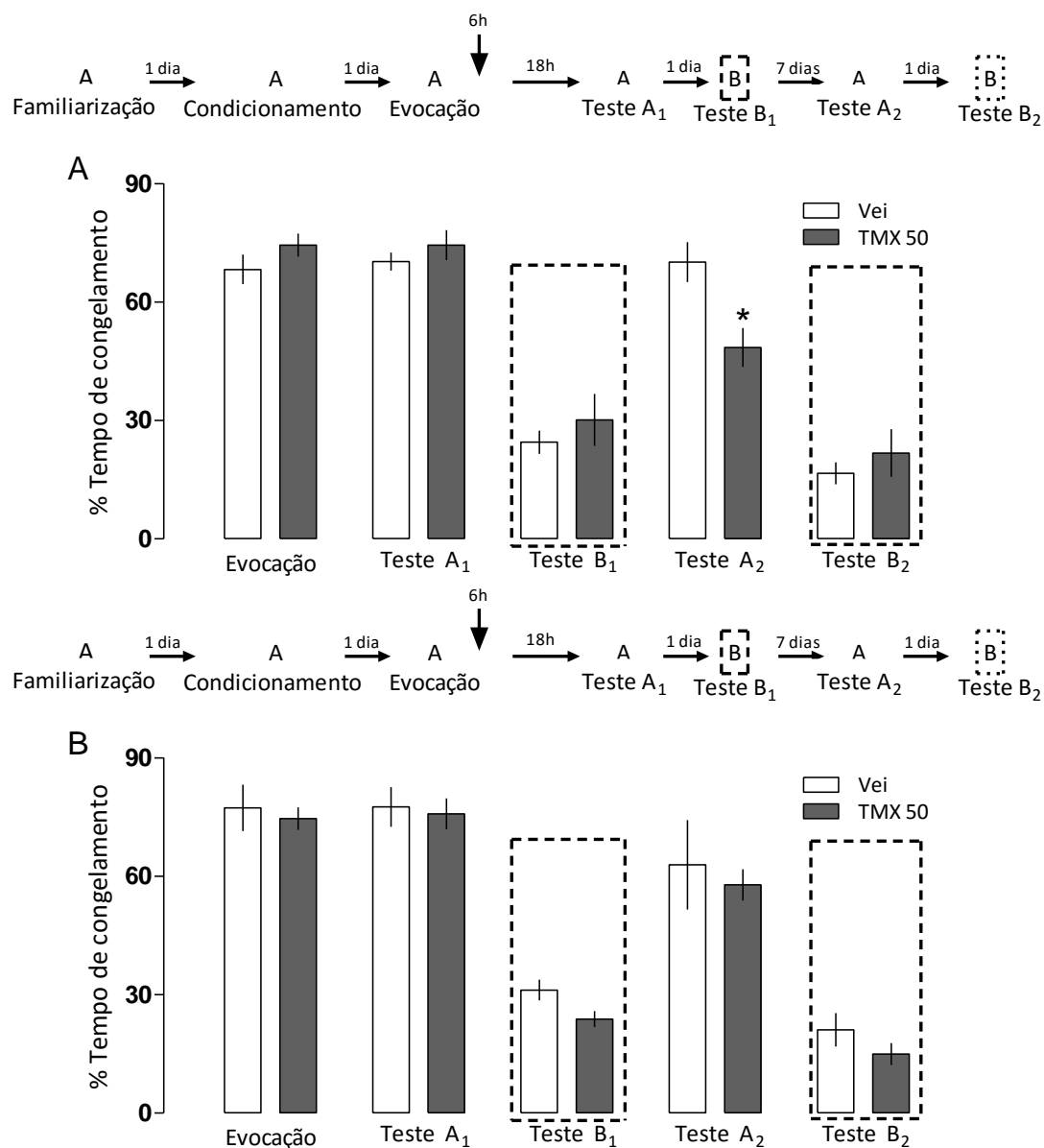


Figura 9. O efeito do TMX (50 mg/ kg) 6 horas após ativação é dependente da fase do ciclo estral de ratos fêmea. (A) o comportamento de congelamento manteve-se a mesma durante a reativação e teste A₁, mas durante a exposição ao teste A₂ o grupo tratado com TMX apresentou menor comportamento de congelamento do que os controles, em fêmeas que não estavam na fase estro do ciclo estral. Durante o teste B não houve diferença. (B) O mesmo experimento foi realizado com fêmeas que estavam na fase estro do ciclo estral e nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos durante o teste A₁ e teste A₂. Além disso, não foram encontradas diferenças durante exposições ao contexto B. O esquema acima do gráfico representa o delineamento experimental adotado. A seta indica o momento da administração do fármaco. As barras representam a porcentagem de tempo total de congelamento. Os valores são expressos como média ± SEM. * Diferença significativa (P < 0,05) do respectivo grupo de controle

7. Discussão

A administração de TMX imediatamente após a reativação de memória reduziu o tempo do comportamento de congelamento em animais expostos ao contexto condicionado apenas 9 dias mais tarde, mas a memória permaneceu intacta um dia após o tratamento, sugerindo um efeito específico na persistência da memória, mas não na reconsolidação da memória. Não há estudos anteriores sobre a inibição PKC mostrando que eventos tardios são recrutados especificamente para a persistência da memória e acionado imediatamente após reconsolidação da memória. Confirmando achados anteriores, o midazolam prejudicou a reconsolidação da memória de medo, descartando a possibilidade de que a exposição ao contexto condicionado (contexto A) poderia levar a extinção da memória (BUSTOS et al, 2006; STERN et al, 2012), poderia ser observado um efeito do MDZ prejudicando a extinção da memória, mantendo níveis elevados de congelamento se fosse esse o caso. Reforçando a hipótese de que TMX prejudica especificamente o mecanismo de persistência da memória, quando administrado imediatamente após a sessão de treino (ou seja, durante a fase de consolidação), o TMX prejudica também a persistência de memória sem afetar a formação da memória, reduzindo o comportamento de congelamento apenas 8 dias depois. Este resultado está de acordo com relatos que mostram que as interferências feitas durante a fase de consolidação podem afetar seletivamente a manutenção da memória (SACKTOR et al., 2012).

Se o efeito do TMX é devido a interferências nos mecanismos de persistência da memória, pode se esperar que a administração de TMX em diferentes pontos de tempo após a reconsolidação da memória produziria um efeito tardio semelhante. Na verdade, quando administrado 6 ou 9 horas após a reativação da memória, o TMX reduziu comportamento congelamento após 9 dias, mas não um dia após o tratamento, confirmando uma interrupção na persistência da memória, induzida por TMX, mas não ocorrendo interferência na reconsolidação da memória per se, pois um dia após a reativação a memória manteve-se intacta. Estes resultados estão de acordo com os relatos anteriores que mostram que a inibição da síntese proteica na amígdala

basolateral 9,5 horas após a reativação da memória prejudica a sua manutenção (NAKAYAMA et al., 2013). Além disso, demonstrou-se que a expressão de arc na amígdala basolateral 11 horas após a recuperação, mas não 6 ou 24 horas, é necessário para a persistência da memória (NAKAYAMA et al., 2016). Aqui, observamos que em 6 e 9 horas, mas não 12 horas após a recuperação a persistência da memória pode ser interrompida. As discrepâncias encontradas podem ser devido aos diferentes mecanismos de ação estudados e as vias de administração de drogas diferentes utilizadas. No presente estudo a administração foi sistêmica e no relato anterior a administração da droga foi na amígdala basolateral (NAKAYAMA et al., 2013; 2016). Possivelmente, o presente resultado poderia ser por conta do papel da PKM ζ . Como mostrado em experiências eletrofisiológicas, onde a PKM ζ foi inibida em blocos da potenciação a longo prazo quando aplicado 1, 3 ou 5 horas após a estimulação tetânica sem alteração da LTP precoce (SERRANO et al., 2005). Além disto, a sua expressão em diferentes áreas do cérebro é crítica para a persistência da memória (SACKTOR et al., 2012).

Outro resultado importante foi o efeito tardio de longa duração que foi induzido pelo TMX. Esse resultado está de acordo com estudos que mostram nenhuma recuperação da resposta de medo após 14 dias (KATCHE et al., 2010). Este período foi prorrogado até 22 dias, no nosso caso, reforçando a idéia de que o TMX interferiu com a persistência da memória, em vez de promover a extinção em nossas condições de protocolo.

Usando o medo contextual (BUSTOS et al., 2006; STERN et al., 2012) ou auditivo (DUVARCI & NADER, 2004), as tarefas de memória espacial (PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1997) e outros paradigmas de memória (FUKUSHIMA et al., 2014), o autores mostraram que tratamentos administrados 6 horas após a reativação de memória, ou mesmo mais tarde, não produziu qualquer déficit de memória, o que estabeleceu que o tempo da janela de reconsolidação poderia durar até 6 horas (NADER et al., 2000). Mas neste momento uma nota de cautela deve ser mencionada: na maioria dos trabalhos publicados até agora, interferências feitas 6 horas após a reconsolidação foram avaliadas principalmente 24 horas mais tarde (NADER et al., 2000; BUSTOS et al., 2006; STERN et al., 2012) . Mas e se o efeito de tais

interferências fossem avaliados também após 7 dias? No presente estudo observou-se efeito da administração de TMX após 9 horas.

Com o surgimento de conceitos de persistência da memória é muito recente, essa questão permanece indefinida e deve ser levado em conta com mais frequência a partir de agora. Outra questão importante que surge a partir destes resultados é: o efeito do TMX tardio é dependente da reconsolidação da memória? Administrando o TMX 6 horas após a omissão da recuperação da memória, a persistência da memória foi poupada de interferências. Este resultado reforça a existência de um novo recrutamento tardio de cascatas relacionadas com a persistência da memória após a reconsolidação da memória, e também é consistente com trabalhos anteriores que mostram que a reconsolidação depende de uma breve recuperação da memória (NADER et al., 2000; BUSTOS et al., 2006 ; STERN et al., 2012; GAZARINI et al., 2013). No entanto, embora a recuperação nem sempre seja capaz de induzir a reativação e reconsolidação da memória (GISQUET-VERRIER & RICCIO, 2012), sabe-se que a memória ainda pode ser atualizada e modificado de forma independente de reconsolidação (GIACHERO et al., 2013). A ativação de canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo-L (LVGCC) é necessária para a reativação/labilização da memória (SUZUKI et al., 2008), e administração de drogas que alteram a cinética intracelular de Ca^{++} se tornou útil como ferramenta farmacológica para investigar a dependência de mecanismos de reativação e interferências na memória (HAUBRICH et al., 2015). Descobrimos que a administração de nimodipina antes da recuperação da memória não perturba a expressão do comportamento de medo durante esta sessão, mas impediu o efeito de atenuação promovido pelo TMX tardio sobre o medo, confirmando que tal efeito é realmente dependente de mecanismos desencadeados pela reconsolidação da memória. Estes resultados estão de acordo com o relato que mostrou que prejudicando a reativação da memória com a administração de ifenprodil (inibidor NMDA) na amígdala basolateral aboliu o efeito de inibição da expressão Arc na persistência da memória (NAKAYAMA et al., 2016), confirmando que a reconsolidação da memória induz mecanismos tardios que são fundamentais para a persistência da memória.

Embora a incidência de TEPT é mais proeminente em mulheres (SCHNURR & LUNNEY, 2016), a maioria dos estudos sobre os mecanismos de memória ou possíveis ferramentas farmacológicas para o tratamento desta condição são realizados em machos. Quando testado em fêmeas, a administração de TMX 6 horas após a reativação da memória resultou na atenuação do comportamento de congelamento semelhante ao observado nos ratos machos, sugerindo que efeito do TMX é independente do gênero. Esse efeito, no entanto, só foi observado em fêmeas na fase não estro do ciclo estral, com menor secreção de estrogênio (WESTWOOD, 2008). Quando submetidos ao mesmo protocolo, fêmeas na fase estro do ciclo estral tratadas com o TMX 6 horas após a reativação da memória não eram suscetíveis à deterioração persistência da memória. Esta falta de efeito pode ser devido a diferenças nos níveis de estrogênio que podem se restaurar por uma dose diferente TMX. Embora este fenômeno ainda não está elucidado, no entanto, este resultado também chama a atenção para uma menor resistência de memória em um período específico de ciclo feminino. Sintomas de TEPT são freqüentes após sessões de quimioterapia em pacientes com câncer de mama (HERMELYNK, 2015). No entanto quanto o TMX é um adjuvante na terapia a incidência de TEPT é reduzida (ANDRIKOWISKI & CORDOVA 1998).

Embora a etapa de consolidação representa um estado frágil da memória do medo, ela não oferece uma potencial janela terapêutica para a interferência da memória, uma vez que sua modulação teria de ser feita logo após a ocorrência do evento traumático. Assim, a reconsolidação, considerado um mecanismo responsável pela atualização de memória e manutenção ao longo do tempo, surgiu como um potencial e mais adequada oportunidade de modificar tais memórias, uma vez que pode ser desencadeada por recuperação da memória em circunstâncias controladas (DE OLIVEIRA et al., 2013) . No presente trabalho nós mostramos fortes evidências de que reconsolidação também fornece uma estratégia para modular especificamente a persistência de memórias relacionadas ao medo. Considerando o papel da PKC e a isoforma PKM ζ que é constitutivamente ativa presentes no neocórtex e hipocampo participam da manutenção da memória (SACKTOR, et al., 2012), o

TMX parece ser um potencial tratamento farmacológico para a persistência de memórias traumáticas.

8. Conclusão

Em resumo, o presente trabalho proporciona a evidência de que TMX atenua a persistência da memória do medo de uma maneira duradoura. O efeito tardio induzido pelo TMX é dependente de reativação da memória e reconsolidação e é observado em machos e fêmeas. Ao todo, o presente trabalho abre novos caminhos na pesquisa de efeitos tardios induzidos pela reconsolidação da memória, ampliando a janela de tempo em que as interferências na memória pode ser usado como uma potencial estratégia terapêutica em transtornos mentais.

9. Referências

ABRIAL, E, ETIEVANT A, BÉTRY C, SCARNA H, LUCAS G, HADDJERI N, LAMBÁS-SEÑAS L. Protein kinase C regulates mood-related behaviors and adult hippocampal cell proliferation in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 43:40-8, 2013.

ALBERINI C, LEDOUX J. Memory reconsolidation. **Curr Biol**. 23: 746-50, 2013.

ANDRYKOWSKI, M. A., CORDOVA, M. J. Factors associated with PTSD symptoms following treatment for breast cancer: Test of the Andersen model. **J Traumatic Stress**, 11(2), 189–203, 1998.

ARMANI F, ANDERSEN ML, GALDURÓZ JC. Tamoxifen use for the management of mania: a review of current preclinical evidence. **Psychopharmacology**. 231(4):639-49, 2014.

BEKINSCHTEIN, P., CAMMAROTA, M., IGAZ, L. M., BEVILAQUA, L. R. M., IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, 53(2), 261–77, 2007.

BEKINSCHTEIN, P., KATCHE, C., SLIPCZUK, L., GONZALEZ, C., DORMAN, G., CAMMAROTA, M., MEDINA, J. H. Persistence of Long-Term Memory Storage: New Insights into its Molecular Signatures in the Hippocampus and Related Structures. **Neurotoxicity Research**. 18(3-4), 377–385, 2010.

BITENCOURT RM, PAMPLONA FA, TAKAHASHI RN. Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. **Eur Neuropsychopharmacol**. 8(12):849-59, 2008.

BONINI JS, DA SILVA WC, BEVILAQUA LR, MEDINA JH, IZQUIERDO I, CAMMAROTA M. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Neuroscience**. 47(1):37-45, 2007.

BUSTOS, S. G., MALDONADO, H., MOLINA, V. A. Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. **Neuroscience**, 139(3), 831–42, 2006
Colley Pa, Sheu Fs, Routtenberg A. Inhibition of protein kinase c blocks two components of ltp persistence, leaving initial potentiation intact. **J Neurosci**. 10: 3353-60, 1990.

CRESTANI, A. P., BOOS, F. Z., HAUBRICH, J., ORDOÑEZ, R., SANTANA, F., MARCELA, J., QUILLFELDT, J. A. Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation. **Nature Publ Grp** 1–9, 2015.

DE LA FUENTE, V., FEDERMAN, N., ZALCMAN, G., SALLES, A., FREUDENTHAL, R., ROMANO, A. NF- κ B transcription factor role in consolidation and reconsolidation of persistent memories. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, 8(9), 1–9, 2015.

DE OLIVEIRA ALVARES, L., CRESTANI, A. P., CASSINI, L. F., HAUBRICH, J., SANTANA, F., QUILLFELDT, J. A. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: Exploring the possible biological roles of reconsolidation. **Neuroscience**. 244(4), 42–48, 2013.

DEBIEC J, LEDOUX JE. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. **Neuroscience**. 129(2):267-72, 2014.

DUDAI Y. The neurobiology of consolidation, or, how stable is the engram? **Annu Rev Psychol**. 55:51-86, 2004.

DUVARCI, S., NADER, K. Characterization of Fear Memory Reconsolidation. **J Neuroscience**, 24(42), 9269–9275, 2004.

EINAT H, YUAN P, SZABO ST, DOGRA S, MANJI HK. Protein kinase C inhibition by tamoxifen antagonizes manic-like behavior in rats: implications for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. **Neuropsychobiology**. 55(3-4):123-31, 2007.

FUKUSHIMA, H., ZHANG, Y., ARCHBOLD, G., ISHIKAWA, R. Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation. **eLife** 1–19, 2014.

GAZARINI, L., STERN, C. A. J., CAROBREZ, A. P., BERTOGLIO, L. J. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting α 1- and β -adrenergic receptors. **Learning & Memory**. 20(4), 210–9, 2013.

GIACHERO, M., CALFA, G. D., MOLINA, V. A. Hippocampal structural plasticity accompanies the resulting contextual fear memory following stress and fear conditioning. **Learn Mem**. 20(11), 611–616, 2013.

GIORDANO G, SÁNCHEZ-PÉREZ AM, MONTOLIU C, BEREZNEY R, MALYAVANTHAM K, COSTA LG, CALVETE JJ, FELIPO V. Activation of NMDA receptors induces protein kinase A-mediated phosphorylation and degradation of matrin 3. Blocking these effects prevents NMDA-induced neuronal death. **J. Neurochem.** 94;808-18, 2005.

GISQUET-VERRIER, P., RICCIO, D. C. Memory reactivation effects independent of reconsolidation. **Learn Mem.** 19(9), 401–409, 2012.

GLANZMAN, D. L. PKM and the Maintenance of Memory. **Biology Reports** 2013, 5:4 9: 1–9, 2013.

HAUBRICH, J., CRESTANI, A. P., CASSINI, L. F., SANTANA, F., SIERRA, R. O., DE OLIVEIRA ALVARES, L. Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. **Neuropsychopharmacology** 40: 315-326, 2014.

HEBB D. O. The Organisation of Behaviour. New York: **Wiley**, 1949

HERMELINK K. 2015. Chemotherapy and cognitive function in breast cancer patients: The so-called chemo brain. **J Nat Cancer Inst**, (51), 67–69, 2015.

JANICAK, PHILIP G.; DAVIS, JOHN M.; PRESKORN, SHELDON H.; AYD, FRANK J.; MARDER, STEPHEN R.; PAVULURI, MANI N. Assessment and Treatment of Anxiety-Related Disorders. em: Principles & Practice of Psychopharmacotherapy, 4th Edition, 2006 Lippincott Williams & Wilkins.

JUNG M., WATSON DG., SIMPKINS JW. Suppression of protein kinase C_α mediates 17β-estradiol-induced neuroprotection in an immortalized hippocampal cell line. **J Neurochem.** 95;745-55, 2005.

KATCHE, C., BEKINSCHTEIN, P., SLIPCZUK, L., GOLDIN, A., IZQUIERDO, I. A., CAMMAROTA, M., MEDINA, J. H. Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. **PNAS.**107(1), 349–54, 2010.

LEDOUX, J. E. Emotional circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.** 23:155–184, 2000.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F.; TANNO, A. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian J Biology**, 62(4), 609–614, 2002.

MCGAUGH JL. Memory a century of consolidation. **Science.** 287:248-51, 2000.

NADER, K., SCHAFE, G. E., LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, 406(6797), 722–726, 2000.

NAKAYAMA, D., YAMASAKI, Y., MATSUKI, N., NOMURA, H. Post-retrieval late process contributes to persistence of reactivated fear memory. **Learn Mem.** 20: 307–310, 2013.

NAKAYAMA, D., HASHIKAWA-YAMASAKI, Y., IKEGAYA, Y., MATSUKI, N. Late Arc / Arg3 . 1 expression in the basolateral amygdala is essential for persistence of newly-acquired and reactivated contextual fear memories. **Nature reports scientific** 6: 1–10, 2016.

NINOMIYA EM, MARTYNHAK BJ, ZANOVELI JM, CORREIA D, DA CUNHA C, ANDREATINI R. Spironolactone and low-dose dexamethasone enhance extinction of contextual fear conditioning. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 34(7):1229-35, 2010.

NISHIZUKA Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. **Nature.** 334;661-5, 1988.

PARSONS RG, RESSLER KJ. Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. **Nat Neurosci.** 16(2):146-53, 2013.

PAVLOV IP. Conditioned Reflexes. London: **Oxford University Press.** 1927.

PEREIRA M, ANDREATINI R, SCHWARTING RK, BRENES JC. Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania? **Psychopharmacology** (Berl), 2014.

PHELPS EA, LEDOUX JE. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. **Neuron.** 48: 175-87, 2005.

PRZYBYSLAWSKI, J., SARA, S. J. Reconsolidation of memory after its reactivation. **Behavioural Brain Research.** 84, 241–246, 1997..

SABIONI P, BARETTA IP, NINOMIYA EM, GUSTAFSON L, RODRIGUES AL, ANDREATINI R. The antimanic-like effect of tamoxifen: Behavioural

comparison with other PKC-inhibiting and antiestrogenic drugs. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 32(8):1927-31, 2008.

SACKTOR, T. C. Memory maintenance by PKMzeta --- an evolutionary perspective. **Molecular Brain**, 5(1), 31, 2012.

SERRANO, P., YAO, Y., SACKTOR, T. C. Persistent Phosphorylation by Protein Kinase M Zeta Maintains Late-Phase Long-Term Potentiation. **Science**, 25(8), 1979 –1984, 2005.

STECKERT AV, VALVASSORI SS, MINA F, LOPES-BORGES J, VARELA RB, KAPCZINSKI F, DAL-PIZZOL F, QUEVEDO J. Protein kinase C and oxidative stress in an animal model of mania. **Curr Neurovasc Res**. 9(1):47-57, 2012.

STERN CA, GAZARINI L, TAKAHASHI RN, GUIMARÃES FS, BERTOGLIO LJ. On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: evidence from cannabidiol treatment. **Neuropsychopharmacology**. 37(9):2132-42, 2012.

STERN CA, GAZARINI L, VANVOSSSEN AC, HAMES MS, BERTOGLIO LJ. Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. **Learn Mem**. 16;21(1):14-20, 2013.

SUZUKI, A., MUKAWA, T., TSUKAGOSHI, A., FRANKLAND, P. W., KIDA, S. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. **Learn Mem**, 15(6), 426–433, 2008.

WESTWOOD, F. R. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. **Toxicologic Pathology**, 36(3), 375–384, 2008.

YILDIZ A, VIETA E, LEUCHT S, BALDESSARINI RJ. Efficacy of antimanic treatments: meta-analysis of randomized, controlled trials. **Neuropsychopharmacology**. 36(2):375-89, 2011.