

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, LETRAS E ARTES
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NEUROCIÊNCIA COGNITIVA E COMPORTAMENTO – PPgNeC

JULIANA SALES DE FREITAS

**ATIVAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE REDES PERINEURONIAIS NO
HIPOCAMPUS DORSAL DE RATOS PRÉ-PÚBERES EXPOSTOS AO
CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO**

JOÃO PESSOA
2024

JULIANA SALES DE FREITAS

**ATIVAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE REDES PERINEURONAIS NO
HIPOCAMPO DORSAL DE RATOS PRÉ-PÚBERES EXPOSTOS AO
CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento da Universidade Federal da Paraíba como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Neurociência Cognitiva e Comportamento.

Linha de pesquisa Psicobiologia: Processos Psicológicos Básicos e Neuropsicologia
Orientador: Prof^o. Dr. Flávio Freitas Barbosa.
Coorientadora: Dr^a. Rochele Castelo-Branco

JOÃO PESSOA, PB

2024



ATA DE DEFESA (DISSERTAÇÃO)

Aos trinta e um dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e quatro, às quatorze horas e trinta minutos, na sala 505 do Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes, reuniram-se em solenidade pública os membros da comissão designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento para a defesa de dissertação de mestrado da discente **JULIANA SALES DE FREITAS**, matrícula 20211020770. Foram componentes da banca examinadora os Professores Doutores: Flávio Freitas Barbosa (Presidente/orientador), Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori (Membro Interno) e Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio (Membro Externo ao Programa – Programa de pós-graduação CTDR). Dando início aos trabalhos, o presidente da banca, Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa, após declarar o objetivo da reunião, apresentou a examinanda JULIANA SALES DE FREITAS e, em seguida, concedeu-lhe a palavra para que defendesse sua pesquisa, intitulada “**ATIVAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE REDES PERINEURONAIS NO HIPOCAMPO DORSAL DE RATOS PRÉ-PÚBERES EXPOSTOS AO CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO**”. Passando então ao aludido tema, a examinanda foi a seguir arguida pelos examinadores na forma regimentar. Ato contínuo passou a comissão, em secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito “**APROVADA**”, o qual foi proclamado pela presidência logo que esta foi franqueada ao recinto da solenidade pública. A versão final da dissertação deverá ser depositada em até 90 dias, contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora. A discente não terá o título se não cumprir as exigências acima. Nada mais havendo a tratar, eu, **FLÁVIO FREITAS BARBOSA**, presidente da comissão examinadora, lavrei a presente ata, que depois de lida e aprovada por todos, assino juntamente aos demais membros da banca. João Pessoa, 31 de janeiro de 2024.

Juliana Sales de Freitas

Juliana Sales de Freitas (Mestranda/PPGNeC)

Documento assinado digitalmente
gov.br FLAVIO FREITAS BARBOSA
Data: 02/02/2024 16:32:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Flávio Freitas Barbosa (Orientador/Presidente)

Documento assinado digitalmente
gov.br MIRIAN GRACIELA DA SILVA STIEBBE SALVADORI
Data: 01/02/2024 10:15:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori (Membro Interno)

Documento assinado digitalmente
gov.br ADRIANA MARIA FERNANDES DE OLIVEIRA GOLZIO
Data: 31/01/2024 16:52:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio (Membro Externo ao Programa)

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F866a Freitas, Juliana Sales de.
Ativação celular e expressão de redes perineuronais no hipocampo dorsal de ratos pré-púberes expostos ao condicionamento de medo ao contexto / Juliana Sales de Freitas. - João Pessoa, 2024.
43 f. : il.

Orientação: Flávio Freitas Barbosa.
Coorientação: Rochele Castelo-Branco.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCHLA.

1. Memória e aprendizado. 2. Memória aversiva. 3. C-fos. 4. PNNs. 5. Hipocampo dorsal. I. Barbosa, Flávio Freitas. II. Castelo-Branco, Rochele. III. Título.

UFPB/BC CDU 159.953(043)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a Deus, a minha família, meus companheiros de laboratório e a todas as pessoas que me apoiaram e ajudaram durante o meu percurso.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1 Memória	13
2.2 Condicionamento do medo	13
2.3 Genes Imediatos	15
2.4 C-fos	15
2.5 Redes Perineuronais	16
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4 MÉTODO	19
4.1 Animais e grupos experimentais	19
4.2 Condução de acasalamentos para obtenção dos filhotes em idade específica	20
4.3 Tarefa de medo condicionado ao contexto e desenho experimental	20
4.4 Análise do comportamento	21
4.5 Perfusão, craniotomia e microtomia	22
4.6 Imunohistoquímica e Contagem de células.....	22
4.7 Análise estatística	23
5 RESULTADOS	24
5.1 Comportamento	24
5.2 Diferenças entre grupos	27
5.3 Diferenças Intragrupo referentes ao sexo	29
5.4 Imunohistoquímica	31
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO	38
8 REFERÊNCIAS	39
ANEXO A - Parecer aprovado pela Comissão Ética no Uso de Animais	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CM	Condicionamento do Medo
CS	Estímulo Condicionado
DAB	DiaminoBenidina
GD	Giro Denteado
HC	Home Case
IEGs	Genes Imediatos
ME	Memória Episódica
mCPF	Córtex Pré-Frontal medial
NaCl	Cloreto de Sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
PND	Dias Pós-Natal
TR-	Condição do Contexto
TR+	Condição de Memória Aversiva
TR+T	Evocação a Memória Aversiva
US	Estímulo Incondicionado
WFA	Wisteria Floribunda

RESUMO

Experiências que acontecem no período de maturação sexual em animais são consideradas críticas, pois nessa fase ocorrem processos como a neurogênese, o crescimento axonal e a sinaptogênese. Os ratos são animais altriciais; passam por eventos biológicos importante no seu período pós-natal, como mudanças estruturais consideráveis na massa cinzenta e aumento da densidade e complexidade dendrítica. Ocorre também a influência de fatores hormonais na adolescência, os quais geram alterações na fisiologia e estrutura cerebral dos animais. O desenvolvimento da memória de informações aversivas ao medo é essencial para a sobrevivência, a qual está vinculada à emoção do medo no animal. Entendendo isso, podemos utilizar o mecanismo de aprendizagem por associação, que configura o condicionamento do medo Pavlovano, para o estudo da memória aversiva. Utilizando este método, o nosso estudo verificou as respostas defensivas, com foco nos comportamentos de self-grooming (autolimpeza), rearing (apoio nas patas traseiras) e freezing (imobilidade), além da investigação do hipocampo dorsal, por meio da expressão de C-fos, que é um gene imediato, e PNNs, que são proteínas que atuam na plasticidade neural, nas diferentes fases do processamento da memória aversiva em ratos com 24 dias de vida, os quais estão na fase da adolescência inicial, período que ainda não compreende a puberdade. Os resultados indicaram que os ratos responderam com freezing durante a aquisição e evocação de memória de medo ao contexto, e observamos que as fêmeas apresentam maior prontidão em expressar freezing comparadas aos machos na fase de recuperação da memória. Além disso, registramos células imunorreativas à C-fos e WFA (indicativas da presença de redes perineuronais) em todo o hipocampo dorsal, em todos os grupos experimentais, e em ambos os sexos. No campo da ontogênese da memória, estes resultados serão ainda mais proveitosos quando comparados com estudos futuros, que visem investigar a neurobiologia de ratos na fase da puberdade.

Palavras-chaves: Memória aversiva, C-fos, PNNs, Hipocampo dorsal.

ABSTRACT

The experiences that occur during the period of sexual maturation in animals are considered critical, as processes such as neurogenesis, axonal growth and synaptogenesis occur at this stage. Rats are altricial animals; undergo important biological events in the postnatal period, such as considerable structural changes in gray matter and increased dendritic density and complexity. There is also the influence of hormonal factors in adolescence, which generate changes in the physiology and brain structure of animals. The development of memory for fear-aversive information is essential for survival, which is linked to the emotion of fear in the animal. Understanding this, we can use the association learning mechanism, which configures Pavlovian fear conditioning, to study aversive memory. Using this method, our study verified defensive responses, focusing on the behaviors of self-cleaning (self-cleaning), elevation (supporting the hind legs) and freezing (immobility), in addition to investigating the dorsal hippocampus, through the expression of C-fos, which is an immediate gene, and PNNs, which are proteins that act in neural plasticity, in the different phases of aversive memory processing in 24-day-old rats, which are at the beginning of adolescence, a period that does not yet understand puberty. The results indicated that the rats responded with freezing during the acquisition and recall of the fear memory to the context, and we observed that females are more willing to express freezing compared to males in the memory retrieval phase. Furthermore, we recorded C-fos and WFA immunoreactive cells (indicative of the presence of perineuronal networks) throughout the dorsal hippocampus, in all experimental groups and in both sexes. In the field of memory ontogenesis, these results will be even more useful when compared with future studies, which aim to investigate the neurobiology of rats during puberty.

Keywords: Aversive memory, C-fos, PNNs, Dorsal hippocampus

1 INTRODUÇÃO

Os ratos são animais considerados altriciais, e seu neurodesenvolvimento aborda uma série de eventos no estágio embrionário e durante o período pós-natal, que compreende processos biológicos importantes, sofrendo influências de fatores ambientais, desde o nascimento até a sua fase de maturação sexual (Smith EFS, 1991. Terranova ML; Laviola G, 1995. Gibb R. L, 2005.). As experiências que acontecem nesse período, considerado sensível, podem trazer consequências comportamentais e fisiológicas de longo prazo para esses animais. Entre as características típicas dessa fase pode-se citar a neurogênese, o crescimento axonal e a sinaptogênese.

Na fase inicial do pós-natal (caracterizado em dias pós-natal ou PND) 0-5 dias ocorrem mudanças estruturais consideráveis na massa cinzenta, aumento da densidade e complexidade dendrítica. Em PND7 inicia um expressivo crescimento cerebral, tendo sua porcentagem máxima de volume da maioria das estruturas cerebrais ocorrendo em PND20, onde também há um pico na mielinização (Dobbing; Sands, 1979. Bockhorst KH et al; 2008. Workman et al; 2013. Semple et al; 2013). No período da adolescência ocorrem refinamentos dos circuitos neurais (PND21), que percorre até a fase adulta (PND60). Na adolescência ocorrem mudanças ontogenéticas no hipocampo, havendo um pico na densidade de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) no córtex temporal em PND28 (Pokornný, J.; Yamamoto, T., 1981. Brust et al 2015.), sendo o pico da neurogênese hipocampal na fase anterior (PND14-17) (Rice, D.; Barone. S Jr, 2000. Semple; Bridgette D. et al.; 2013). Entre as mudanças no período da adolescência, encontramos um rearranjo funcional na amígdala, e em outras estruturas como o córtex pré-frontal medial (mPFC), córtex cingulado anterior e ínsula. Acontece também a influência de fatores hormonais, os quais geram alterações na fisiologia e estrutura cerebral dos animais, ativando receptores de andrógenos e estrógenos no córtex cerebral (Pierkarski et al. 2017. Juraska; Willing, 2017). A adolescência se caracteriza por modificações cerebrais importantes, particularmente sensíveis a eventos estressores (Piekrski et al. 2017).

A memória para informações aversivas, ou memória do medo, é fundamental no processo adaptativo e de sobrevivência. O medo é uma emoção que se desenvolve por meio de um conjunto de circuitos ativados por estímulos acessados por um estado que seja considerado perigoso, o qual pode ser tratável ou operacionalizado através de nivelamentos. Entre os mecanismos que podem ser utilizados estão o de aprendizagem por associação e os direcionados ao papel exercidos pelo circuito septo-hipocampal no processo de ansiedade.

Segundo os estudos de Pavlov (1927), sabe-se que a associação de um estímulo condicionado (CS) a um estímulo incondicionado (US) geram respostas fisiológicas e comportamentais inatas, levando os animais a utilizarem estratégias de defesa; entre elas podemos encontrar o freezing, rearing e self-grooming em roedores. As reações incluem também respostas autonômicas e endócrinas, envolvendo a liberação de hormônios e a atividade de genes imediatos (Ledoux; Joseph E, 2000). Nestes processos atua o circuito corticolímbico, o qual constitui uma rede formada pela amígdala, o hipocampo e pelo mPFC, dentre outras estruturas, formando projeções que são recíprocas e interligadas (Bear et al. 2007).

Segundo Zimmermann et al. (2019), um cérebro imaturo que é exposto a eventos estressores afeta o seu neurodesenvolvimento, o que pode levar a transtornos psiquiátricos originados nas fases ontogenéticas iniciais. Assim, obtendo uma compreensão sobre a memória aversiva durante a ontogênese, podemos fornecer oportunidades para perspectivas translacionais.

No campo da Ontogênese da Memória, cabe citar a amnésia infantil, que se caracteriza pela impossibilidade, na vida adulta, de evocar memórias do início da vida (Alberini; Travaglia, 2017) – um fenômeno que lança luz às diferenças ontogenéticas no processamento mnemônico. Ao relacionar a neurogênese e o esquecimento, Gão et al. (2018) afirmam que novos neurônios, surgidos no processo de desenvolvimento, podem acabar por competir com neurônios pré-existentes, como as assembléias neurais que constituem os engramas, havendo uma relação inversa entre formação de memórias e taxa de neurogênese. Tal ideia é apoiada pelo fato de roedores precoces (que têm taxa de neurogênese pós-natal baixa no hipocampo) não apresentarem amnésia infantil.

A literatura vem expondo que as memórias infantis também podem estar sendo armazenada de forma latente, e não necessariamente sendo perdidas ou esquecidas, o que faz com que essas memórias possam ser recuperadas e acessadas por meio de pistas específicas ou por estimulação artificial do traço de memória (Heim, C.; Nemeroff, C. B., 2001. Josselyn, S. A et. al; 2012. Gao, A., Xia, F., Guskjolen, A. J., Ramsaran, A. I., et al. 2018. Frankland, P.W et. al. 2019).

Quanto às diferenças no processamento mnemônico ao longo da vida, alguns autores destacam que os mecanismos moleculares ativados no hipocampo diferem entre animais imaturos e adultos (Donato et al. 2020). Neste contexto, sabe-se que a expressão de genes imediatos (IEGs) se destaca como uma forma de investigar os mecanismos subjacentes ao processamento mnemônico. Esses genes atuam em processos de codificação, armazenamento e evocação de informações, em diferentes idades (Barbosa, F. F.; Silva, R. H., 2018. Bessières

et al. 2020). Há uma diversidade desses genes descritos, no entanto os seus padrões de ativação neural não são idênticos, pois refletem vias de sinalização celular diferentes. Entre esses IEGs, C-fos é um dos mais estudados (Kinnavane, L. et al. 2015). C-fos atua na regulação de transcrição de outros genes *downtream* associados à plasticidade sináptica. A análise de diferentes IEGs pode nos fornecer insights quanto aos mecanismos subjacentes à formação de um traço de memória (Lanahan A.; Worley P., 1998).

Outro mecanismo subjacente no processamento mnemônico envolve a composição estrutural do parênquima cerebral. Para a estabilidade e regulação da plasticidade sináptica, sugere-se que proteínas da matriz extracelular; as redes perineuronais (PNNs), sejam fundamentais. As PNNs podem interferir sobremaneira no equilíbrio excitatório-inibitório em neurônios piramidais, os quais são espontaneamente evocados (Sunayana B. et al. 2017). Em cérebros maduros desempenham um papel crucial na plasticidade sináptica, formando uma barreira física que controla as mudanças na formação de novas conexões entre os neurônios, o que permite ou pode inibir a conexão entre o axônio de um neurônio ao corpo de outro neurônio (Corveti, L. & Rossi, F. 2005). Em cérebros que estão em desenvolvimento pode haver altos níveis de expressões de componentes da matriz, observados antes do pico da sinaptogênese pós-natal (Dino, M.R et al. 2006).

Sendo assim, o presente estudo fornece uma investigação do comportamento defensivo e do hipocampo dorsal associado à expressão de C-fos e PNNs, nas diferentes fases do processamento da memória aversiva em ratos com PND24, os quais são indivíduos na fase da adolescência inicial, período que ainda não compreende a puberdade.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Memória

A memória certamente faz parte das funções cognitivas mais complexas que conhecemos. Estudos sugerem que o aprendizado e o armazenamento de novas informações atuam causando alterações estruturais sobre o sistema nervoso (Dalmaz; Alexandre Netto, 2004). Podemos dividir a memória em memória implícita (não necessita de um processo consciente para a evocação) e memória explícita (evocada por um processo consciente) (Squire; Zola, 1996). A memória explícita se divide em: memória semântica (identifica um evento que aconteceu no passado, e sabe-se do que se trata e se tem a consciência da informação da memória evocada, sem informações e contexto espaço-temporais, formando memória de longo prazo, que consiste em um conhecimento geral sobre o mundo), e memória episódica (ME). Sendo uma das principais memórias do sistema cognitivo, a ME é a memória filogeneticamente mais recente, e com o envelhecimento, começa a sua deterioração (Baddeley et al. 2018). A ME possui a capacidade de ligar o que aconteceu, quando aconteceu e onde aconteceu – a capacidade de se voltar ao passado, utilizando o tempo subjetivo, é possível graças à consciência auto-noética, pois é ela quem traz ao indivíduo a sensação de ser o protagonista que realizou o evento lembrado da maneira que está sendo recordado. Para que esses processos aconteçam, a ME necessita de uma distribuição de eventos conectados, que estão relacionadas a regiões cerebrais corticais e subcorticais, as quais se sobrepõem, e que estão presentes em outros sistemas de memória (Tulving; Markowitsch 1998. Tulving, 2002). Sabe-se do envolvimento hipocampal nas memórias declarativas, assim como nas memórias aversivas adquiridas em contexto conspícuo, em função do papel do hipocampo em construir representações relacionais (Eichenbaum, 2004). Assim sendo, o protocolo de condicionamento de medo ao contexto é uma das formas de acessar a função hipocampal em processos mnemônicos (Rudy et al. 2004).

2.2 Condicionamento do medo

Podemos definir etologicamente o medo como sendo um estado motivacional que ocorre através de estímulos específicos, os quais darão origem a comportamentos de defesa ou de fuga (Steimer, 2002. Boissy, 1995), proporcionando o enfretamento de uma situação adversa ou inesperada. Em uma perspectiva evolutiva, o medo conduz o indivíduo a acessar o melhor mecanismo comportamental para aumentar a chance de sobreviver ao evento que se apresenta. Em situações que ocorram estresse ou dor, os animais aprendem a temê-la, e ao

reencontrar tal situação, apresentam um comportamento de evitação. Porém, animais jovens podem apresentar reação inata a diferentes estímulos que despertem medo, de forma que o medo não ocorre apenas por perigo conhecido e iminente (Steimer, 2002. Boissy, 1995).

Elaborado por Ivan Petrovich Pavlov em 1927, o condicionamento clássico ou condicionamento de Pavlov, trouxe maneiras de desvendar mecanismos neurais subjacentes do medo. A aprendizagem do animal a estímulos ambientais que predizem acontecimentos aversivos elicia resposta de defesa (a qual é inata), favorecendo as chances de sobrevivência do indivíduo (Maren; Stephen, 2001). Esse procedimento envolve a apresentação de um estímulo condicionado (CS) neutro, o qual habitualmente é um som, associado a um estímulo incondicionado (US), que pode ser nocivo ou aversivo, como um choque elétrico leve. Este protocolo envolve a expressão do comportamento natural da espécie, juntamente com reações fisiológicas que são controlados pelo sistema nervoso autônomo e por alterações do sistema endócrino (Ledoux; Joseph E., 2014).

Em decorrência do condicionamento, um estímulo evoca a resposta de outro, ou seja: um acontecimento traumático ou aversivo (estímulo) pode ocasionar uma resposta comportamental no indivíduo, o qual formou representações neurais daquele ambiente/momento (Maren; Stephen, 2001). A busca pelas vias cerebrais que estão envolvidas no condicionamento do medo (CM) definiu a amígdala como o local de início da cascata de eventos que leva o indivíduo a desenvolver esse CM. Resumidamente, acredita-se que a transmissão (informação do ambiente) sobre o CS é passada para a amígdala, que, então, a transmite para várias redes de controle, as quais irão executar uma resposta condicionada ao tronco cerebral. Envolvido nesse processo de CM encontramos o hipocampo, o qual se projeta para a amígdala e atua no processamento de estímulos contextuais que estão associados às referências do ambiente (Ledoux; Joseph, 1998).

Por consequência, os animais podem construir estratégias para se livrar de uma possível ameaça que pode ser ativa ou passiva. O freezing é uma estratégia passiva de enfrentamento, onde o animal permanece imobilizado ou congelado em uma posição. Geralmente o freezing ocorre quando o animal se depara com uma ameaça inevitável, ocasionando uma inibição autônoma. Estratégia ativa de enfrentamento, como a fuga, geralmente é utilizada quando o animal se depara com uma situação em que consegue escapar, e então corre de tal ameaça (Steimer, 2002). As estratégias possuem papéis distintos, sendo articuladas pelo medo e também pela avaliação cognitiva da probabilidade de sucesso iminente.

Precisamos entender a fisiologia do organismo que estamos trabalhando, o seu

desenvolvimento e fases de vida para estabelecer o seu ciclo. Segundo Hunt e colaboradores (2016) ratos adolescentes (PND 24) que acabaram de passar pela fase do desmame possuem suficientemente funcionalidade no sistema básico do medo. Por exemplo, Hefner e Holmes (2007), em seu estudo sobre os efeitos do etanol, o qual incluiu, entre outras variáveis, pares de tom-choque, observaram que camundongos adolescentes com 4 semanas apresentam diferente nível de freezing e maior vulnerabilidade à intoxicação quando comparados aos de 6 semanas e os de 8 semanas. Mesmo todos esses animais estando no período da adolescência, existem diferenças significativas entre as idades, sendo importante a análise ontogenética comparativa.

2.3 Genes Imediatos

Genes Imediatos (IEGs) são aqueles que após a ocorrência de um determinado estímulo celular atuam com rápida ativação de transcrição (em minutos) (Barbosa & Silva, 2018). Os IEGs possuem expressão baixa e indetectável em células quiescentes (células que não estão em fase de proliferação), no entanto em células que estão no período de transcrição, esses IEGs são bem detectáveis e possuem tempo de meia-vida curto, o que transforma a sua expressão em um papel de regulador, que podem sinalizar seus produtos protéicos quando ocorre um estímulo externo (Sheng; Greenberg, 1990). Os IEGs nos permite detectar circuitos neurais em processos que envolvem memória e aprendizagem, pois apresentam especificidade espacial (Barbosa; Silva, 2018). Os IEGs podem ser classificados em dois grupos: o de fatores de transcrição reguladores, que influenciam a função celular através dos genes a jusante (downstream) que regulam, e os do grupo de efetores, que controlam diferentes funções celulares específicas (Kinnavane; Albasser, 2015). Sabendo disso, podemos fazer a associação de tarefas comportamentais, como o condicionamento do medo contextual, a métodos que identifiquem a ativação de áreas neurais, como uma forma de se avaliar as estruturas recrutadas na memória, através da utilização e identificação de IEGs no cérebro (Barbosa; Silva, 2018).

2.4 C-fos

A primeira descrição do IEG C-fos ocorreu através de estudos com células não neurais, na busca de encontrar o gene responsável pelo fator de crescimento (Kelly et al. 1983. Greenberg; Ziff, 1984), e posteriormente as pesquisas mostraram a versatilidade desse gene em diferentes regiões cerebrais.

C-fos faz parte dos IEGs classificados no grupo fatores de transcrição reguladora, está

bem distribuído no cérebro e atua na plasticidade sináptica de longo prazo, podendo ser utilizado apropriadamente na Neurobiologia, pois possui baixo nível de atividade em repouso (Kinnavane, Albasser & Aggleton, 2015). A utilização da expressão de C-fos vem demonstrando o quanto os níveis desse gene podem estabelecer resultados no mapeamento funcional do cérebro. Algumas pesquisas já relacionaram C-fos ao condicionamento do medo, entre elas as que fazem associação do IEG C-fos e a amígdala. Mudanças ambientais de longo prazo, podem ocasionar efeitos significantes na emocionalidade, como mostraram os estudos de Nikolaev, Evgeni et al. (2002) através da atividade diferencial de C-fos nas áreas da amígdala. Além disso, há estudos utilizando C-fos e condicionamento do medo com o foco em outras áreas neurais. Beck e Fibiger (1995) utilizaram C-fos para mapeamento metabólico no condicionamento do medo em rato, identificando neurônios imunorreativos a C-fos em estruturas corticais e subcorticais amplamente dispersas. O estudo de Vann e colaboradores (2000) fez associação de C-fos com o hipocampo para analisar padrões diferenciais de ativação das áreas hipocampal e parahipocampal em ratos, e observaram que durante as tarefas espaciais de memória houve aumento da expressão de C-fos tanto no hipocampo dorsal como ventral. Nos córtices parahipocampais, o perirrinal não mostrou grande ativação de C-fos, mas o entorrinal e o pós-rinal mostraram esse aumento nas duas tarefas. Durante uma tarefa de memória espacial no labirinto aquático, os níveis de C-fos aumentaram em áreas corticais e subcorticais, incluindo o hipocampo e suas conexões (Jenkins, Trisha A. et al. 2003).

Podemos, assim, entender que C-fos está amplamente bem distribuído no hipocampo, e que através dele podemos observar os efeitos do condicionamento do medo nesta área tão importante para a memória e o aprendizado.

2.5 Redes Perineuronais

As redes perineuronais (PNNs) não têm a sua estrutura conhecida em detalhes, mas os estudos sobre estas estruturas são crescentes. Com o auxílio do marcador de lectina-aglutinina isolada de *Wisteria floribunda*, descobriu-se que em diversas áreas do cérebro, e especialmente em torno dos interneurônios de parvalbumina, ocorre a presença de PNNs (Miyata, S. et al. 2018).

A formação das PNNs ocorre pela condensação de diferentes proteínas ao redor de neurônios. Seus principais componentes são o Ácido Hialuronano, Proteoglicanos formadores de PNNs, Tenascina e Proteínas de ligação entre hialuronano e proteoglicano (HAPLN-1, -3 e -4). Esses componentes são sintetizados por neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, que

formam um microambiente único (Lau, L.W. et al. 2013). As PNNs em cérebros adultos desempenham um papel crucial na plasticidade sináptica, formando uma barreira física que controla as mudanças na formação de novas conexões entre os neurônios, o que permite ou inibe a conexão entre o axônio de um neurônio ao corpo de outro neurônio. PNNs podem atuar como limitador da mobilidade dos AMPARs ionotrópicos, ou como andaimes para inibidores de conexões sinápticas (Corvetti, L; Rossi, F. 2005. Saroja, S.R; et al. 2014). Em cérebros em desenvolvimento, podem-se evidenciar altos níveis de expressões de componentes da matriz observados antes do pico da sinaptogênese pós-natal (Dino, M.R; et al. 2006).

As PNNs são refinadas no período do desenvolvimento pós-natal, e podem ser ativadas por estímulos ambientais; as experiências com o ambiente são mediadoras da adaptação do indivíduo ao mundo. A plasticidade cerebral é alta durante os períodos críticos, os quais envolvem regiões cerebrais diferentes ao longo do desenvolvimento, uma vez que existem diferentes períodos críticos para as funções cognitivas, emocionais, sensoriais, de linguagem, entre outros, tornando, assim, o tempo de ocorrência variável (Reh, R.K.; et al. 2020). Esse período representa vulnerabilidade ao indivíduo, pois estão sendo desenvolvidos os seus sistemas e suas conexões, e a ocorrência de consequências negativas, como o estresse, traumas infantis e falta de cuidados, podem trazer danos irreparáveis, pois no final do período crítico ocorre uma estabilidade progressiva nas conexões sinápticas, reduzindo a capacidade da plasticidade cerebral, e tornando as formações e também os danos permanentes (Callaghan, B.L.; Graham, B.M.; Li, S.& Richardson, R. 2014). As PNNs podem interferir sobremaneira no equilíbrio excitatório-inibitório em neurônios piramidais, os quais são espontaneamente evocados (Sunayana B. et al. 2017).

Assim sendo, sabe-se que a memória de medo está associada às PNNs, e a formação destas estruturas coincide com a maturação neuronal (Fawcett et al. 2022; Wang; Fawcett, 2012). Como foram mencionados anteriormente, os mecanismos memmônicos se alteram ao longo da vida, podendo haver mudanças na circuitaria recrutada no processamento de tipos diferentes de memória, o que pode ser avaliado por meio do estudo das áreas neurais ativadas. Ademais, os eventos críticos, como a puberdade, alteram significativamente o cérebro, sendo base para diferenças sexuais permanentes. Embora as maiorias das diferenças sexuais surjam após a puberdade, existem evidências de que algumas características neurobiológicas já se diferenciem no período pré-púbere (Park; Ganella & Kim, 2017; Colon et al. 2018; Park et al., 2020). Desta forma, o presente estudo buscou investigar a memória de medo na fase inicial da adolescência, em ambos os sexos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar as respostas defensivas, a ativação neuronal e a expressão de redes perineuronais no hipocampo dorsal de ratos machos e fêmeas pré-púberes, com 24 dias de vida, submetidos ao protocolo de condicionamento de medo ao contexto.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar diferenças sexuais nos comportamentos de Self-grooming, Rearing e Freezing em ratos com 24 dias de vida durante a codificação e evocação da memória de medo ao contexto;
- Verificar diferenças sexuais no perfil de indução de ativação neuronal, por meio da expressão do gene imediato C-fos, e da plasticidade sináptica, por meio da expressão de redes perineuronais, no hipocampo dorsal de ratos com 24 dias de vida submetidos à codificação e evocação da memória de medo ao contexto.

4 MÉTODO

4.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 96 ratos (*Rattus norvegicus*) (50 machos e 46 fêmeas) da linhagem Wistar, apresentando 24 dias de vida, provenientes do biotério localizado na Unidade de Produção Animal, no IPeFarm, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os animais foram alojados em gaiolas plásticas-padrão (32cmx39cmx16.5cm) e com comida e água disponíveis à vontade, sob um ciclo claro-escuro de 12/12h, com luzes acesas às 06h30 e temperatura em $23\pm 1^{\circ}\text{C}$.

O protocolo experimental utilizado foi a tarefa de medo condicionado ao contexto. Os sujeitos foram designados aos seguintes grupos:

1. Grupo Home Cage (N = 22): Condição neurotípica em PND24. Os animais não foram submetidos ao ambiente experimental. Constituíram este grupo 11 fêmeas e 11 machos;
2. Grupo TR- (N = 20): Codificação do contexto. Os animais foram expostos à caixa de condicionamento, mas não foram submetidos aos choques. Constituíram este grupo 10 fêmeas e 10 machos;
3. Grupo TR+ (N = 31): Codificação da memória aversiva. Os animais foram expostos à caixa de condicionamento e foram submetidos aos choques. Constituíram este grupo 15 fêmeas e 16 machos;
4. Grupo TR+/T (N = 23): Evocação da memória aversiva. Os animais foram expostos à caixa de condicionamento por duas vezes, caracterizando duas sessões: sessão de treino, em que houve aplicação de choques, e sessão de teste, em que os animais foram apenas inseridos no aparato, 24 horas após a sessão de treino. Constituíram este grupo 10 fêmeas e 13 machos.

Todos os animais acima descritos foram incluídos na análise comportamental. Para a análise imunohistoquímica, a qual será descrita a seguir, foi utilizada uma subamostra composta por 17 animais, organizada da seguinte maneira:

1. Grupo Home Cage (N = 4): Constituíram este grupo 2 fêmeas e 2 machos;
2. Grupo TR- (N = 4): Constituíram este grupo 3 fêmeas e 1 macho;
3. Grupo TR+ (N = 4): Constituíram este grupo 2 fêmeas e 2 machos;
4. Grupo TR+/T (N = 5): Constituíram este grupo 3 fêmeas e 2 machos.

Os procedimentos foram conduzidos segundo as normas disponibilizadas pelo CONCEA e reguladas pelo Comitê Local da UFPB, CEUA/UFPB, obtendo aprovação da CEUA,

conforme Protocolo N°2502280121.

4.2 Condução de acasalamentos para obtenção dos filhotes em idade específica

Foram realizados acasalamentos para obtenção da prole em idade pós-nascimento conforme delineamento experimental. O peso e o ciclo estral das fêmeas foram acompanhados diariamente por uma semana. O esfregaço vaginal foi realizado e reconhecido a fase de pró-estro nas fêmeas, um macho escolhido aleatoriamente foi introduzido em gaiola contendo duas fêmeas, entre 17h00 e 18h30. No dia seguinte, entre 7h00 e 8h00 as fêmeas foram observadas para identificação do tampão vaginal, e posteriormente acompanhadas até o quinto dia da provável gestação. De acordo com Coleman et al. (2016), mantemos todas as fêmeas no esquema de luz claro-escuro de 12:12h, sem prejuízo em parâmetros do cuidado materno, que seriam determinantes nas respostas comportamentais da prole.

4.3 Tarefa de medo condicionado ao contexto e desenho experimental

A tarefa de medo condicionado ao contexto compreendeu uma sessão de treino e outra de teste. A sessão de treino configura a codificação da memória aversiva e a sessão de teste configura a evocação desta memória. Na sessão de treino, cuja duração é de 5 minutos, os ratos são alocados individualmente em uma caixa com chão de grade, conectada a um estimulador elétrico. Inicialmente foi permitido os animais explorarem o ambiente, e a partir da metade da sessão, os ratos foram submetidos a 5 choques de 0,5 mA, a cada 30 segundos. Na sessão de teste os animais foram colocados na caixa de condicionamento, mas não receberam choques. Como mencionado anteriormente, os animais foram divididos em quatro grupos: Home Cage, TR-, TR+, e TR+T, de forma que alguns grupos realizaram apenas parte da tarefa (i.e.: sessão de treino, mas não de teste), de acordo com o informado na descrição dos grupos (Figura1).

Posteriormente à realização da tarefa, os animais foram submetidos à eutanásia, perfusão transcardíaca, craniotomia, microtomia e marcação imuno-histoquímica para células positivas à C-fos e Redes Perineuronais. Segundo Pantazopoulos et al (2020), esses marcadores têm maior expressão durante o período noturno, sendo assim, optamos por realizar os experimentos na fase escura (23h30m à 02h30m).

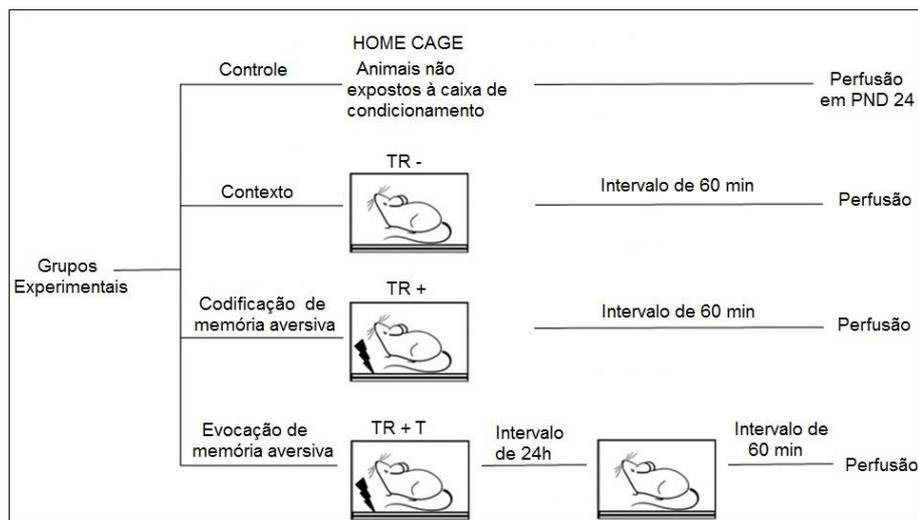


Figura 1 - Tarefa de medo condicionado ao contexto e grupos experimentais.

4.4 Análise do comportamento

Os comportamentos analisados foram:

Freezing, comportamento em que o animal permanece inteiramente imóvel por mais de 1 segundo, a não ser por movimentos referentes à respiração, que é uma resposta de medo amplamente descrita na literatura.

Rearing, quando o animal retira totalmente as patas dianteiras do chão do aparato (foram incluídas nas análises o rearing apoiado em superfície vertical e o sem o apoio).

Self-grooming, comportamento em que o animal faz uma autolimpeza, caracterizado por uma sequência de movimentos estereotipados em ordem cefalocaudal (Kalueff et al. 2016).

O experimento foi filmado e a análise do comportamento foi realizada, posteriormente, por meio do software EthoWatcher (Crispim Junior et al. 2012), um programa que possibilita o registro de categorias comportamentais pré-definidas, caracterizando duração, frequência e latência. Foram conduzidas análises cegas para sexo e grupos experimentais, e os vídeos foram nomeados de forma numérica, sem quaisquer informações acerca do grupo experimental ou sexo dos ratos, visando eliminar possíveis vieses do observador sobre os comportamentos a serem analisados. Foram usados 97 vídeos de 74 animais, contendo sessões de treino e de teste. Na análise dos dados foi utilizada a duração total dos três comportamentos. Em relação ao freezing, além dos dados absolutos, foi utilizada uma variável definida como “porcentagem de tempo em freezing em relação ao tempo total de sessão”, computada como $\text{duração do freezing} * 100 / 300$ nas análises que consideram o

tempo total de sessão e duração total do freezing* 100)/150 nas análises que consideram a primeira ou segunda parte da sessão, considerando-se que é uma medida comum em estudos dessa natureza.

4.5 Perfusão, craniotomia e microtomia

Ao final dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com o uso de sobredose do fármaco anestésico geral tiopental sódico (180mg/kg, via i.p.). Com o animal completamente anestesiado, realizamos o processo de perfusão transcardíaca com impulsão de solução fosfato tamponado (TF 0.1M), em seguida impulsionamos a solução fixadora de paraformaldeído (PFA) 4% em TF 0.1M. Os cérebros foram removidos através de craniotomia e mergulhados por 24 horas em solução 4% de PFA e 30% de sacarose (v/v) em TF 0.1M. Foram feitas secções frontais de 50µm distribuídas em 5 poços contendo solução anticongelante a base de etilenoglicol e TF 0.1M. Após esse processo, os cortes foram armazenados a 4°C até a reação de imunohistoquímica.

4.6 Imunohistoquímica e Contagem de células

Os cortes armazenados em compartimentos foram submetidos ao processo de imunohistoquímica para dupla marcação de C-fos e PNNs, baseada no protocolo avidina-biotina-complexada a peroxidase (ABC). Após lavagens iniciais com TF 0,1M e pré-tratamento com peróxido de hidrogênio seguido de lavagem e imersão em leite, os cortes foram novamente lavados e incubados em solução de anticorpos primários anti-c-Fos; 1:1000 e Triton X100, durante um período de 16 horas. Concluída essa etapa, foram realizadas novas lavagens e as secções foram incubadas por duas horas em solução com anticorpo secundário biotinilado (anti-coelho, 1:1000) e Triton X100. Logo depois foram incubadas por 2 horas em solução contendo avidina-biotina (0,5%) e Triton X100+NaCl. Por fim, as secções foram lavadas e incubadas em solução a 0,05% de diaminobenzidina (DAB) (Sigma Company), por 5 minutos, para a deposição do cromógeno, seguido de tratamento por peróxido de hidrogênio. Após nova lavagem, os cortes foram imersos em *Wisteria floribunda* (1: 5000) e Triton X100, tendo-se aguardado 5 horas para esta reação, sendo, seguida de lavagens. Houve, então, nova rodada de incubação por 2 horas de avidina-biotina (0,5%) e Triton X100+NaCl, seguida de lavagem, e incubação em solução em 0,05% de DAB (Sigma Company), finalizada por tratamento em peróxido de hidrogênio, seguido das lavagens finais. As secções foram montadas em lâminas e cobertas com lamínulas em meio de inclusão (Entellan, Merck) para posterior visualização em microscópio óptico. As imagens foram

digitalizadas e posteriormente analisadas por contagem de células. A contagem de células ocorreu às cegas para as variáveis grupo e sexo, utilizando-se o software Image J. Células reativas para C-fos e PNN foram contadas nas áreas CA1, CA2, CA3 e Giro Denteado do hipocampo dorsal de uma subamostra de cada grupo experimental.

4.7 Análise estatística

Os dados foram analisados no software IBM SPSS Statistics for Windows (versão 27). As diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0.05$. Realizamos os teste de Shapiro-Wilk e de Levene, averiguando desvio de normalidade. Para investigar diferenças sexuais foi usado o teste de Mann-Whitney, e para a diferenças entre grupos o teste de Kruskal-Wallis. O teste de postos sinalizados de Wilcoxon foi utilizado para averiguar diferenças intra-grupos entre partes da mesma sessão (Tr+ e Tr+T) e entre diferentes sessões (Tr+T). Para os dados referentes às células imunoreativas a C-fos e PNNs, foi aplicada apenas análise descritiva (apresentação dos dados em média e desvio padrão).

5 RESULTADOS

5.1 Comportamento

A análise mostrou que o comportamento Self-Grooming não foi apresentado em todos os animais da amostra, se ausentando totalmente em 23 animais, tanto na sessão de treino como na sessão de teste. A média da frequência foi de 1,24 episódio e a média de duração foi de 4 segundos e 20 milésimos.

Para correlacionar a expressão comportamental com a ocorrência do estímulo aversivo, para os animais que receberam choques, foi analisada a ocorrência do comportamento considerando-se as duas metades da sessão de treino (ou seja: na primeira metade da sessão, ou “parte 1 da sessão”, onde não houve a ocorrência de choques, e a segunda metade da sessão, ou “parte 2 da sessão”, em que houve aplicação dos choques). Assim sendo, no caso do Self-Grooming, não foi encontrada diferença significativa entre a parte 1 e a parte 2 da sessão de treino dos grupos TR+ e TR+T (para a frequência: $T = -1,226$; $p = 0,2$; para a duração: $T = -0,083$; $p = 0,9$) (Figuras 2 A e Figura 2 B, respectivamente).

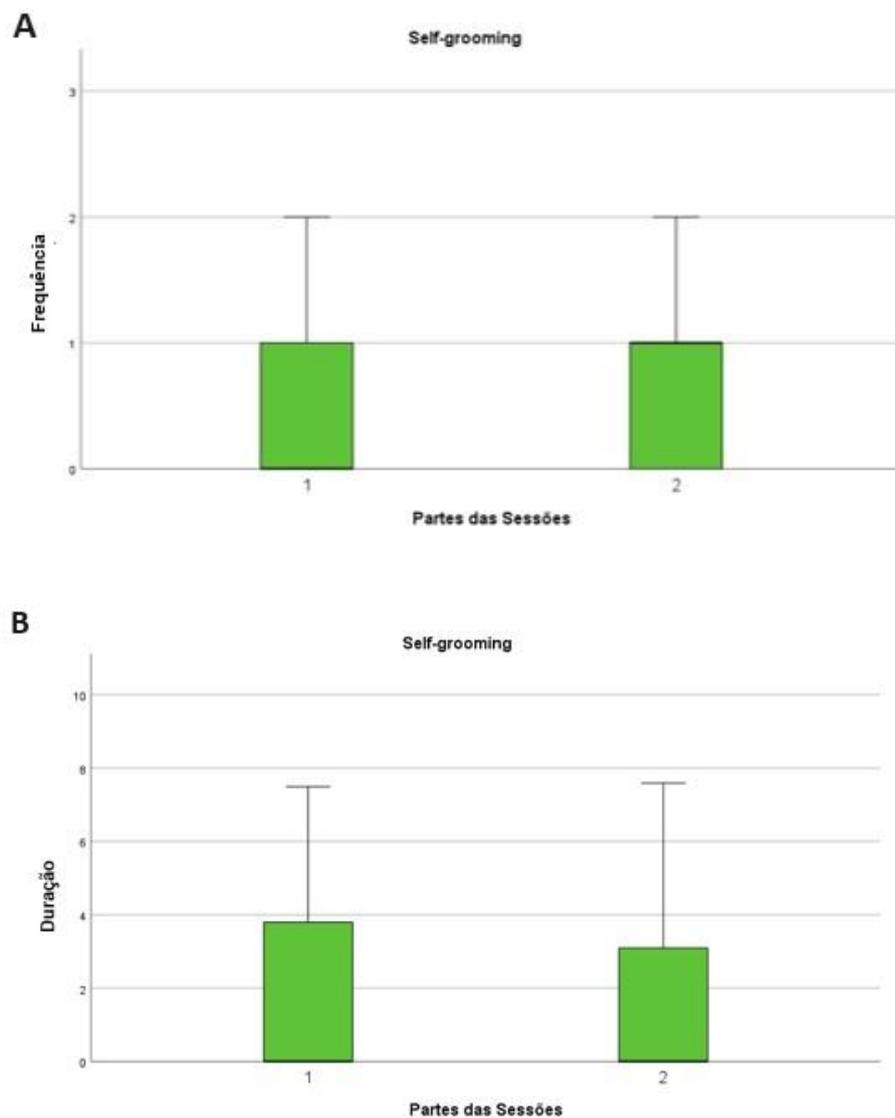


Figura 2 - Ocorrência de Self-Grooming nos grupos TR+ e TR+T, expresso em Frequência (Figura 2A) e Duração (Figura 2B).

O Rearing foi o comportamento mais observado nos animais, com pelo menos uma ocorrência sendo registrada para todos os animais na sessão de treino. A frequência média foi de 11,5 episódios, e duração média total de 28 segundos e 18 milésimos. O Teste de Wilcoxon revelou diferença significativa para os animais que estavam nos grupos que receberam choques, ou seja: houve diferenças entre a parte 1 e a parte 2 da sessão de treino dos grupos TR+ e TR+T, tanto para a frequência ($T = 16,29$, $p < 0,01$), como para a duração ($T = 21,95$, $p < 0,01$). Desta forma, foi observada maior duração e quantidade de Rearing na primeira metade da sessão do que na segunda (Figuras 3A e 3B).

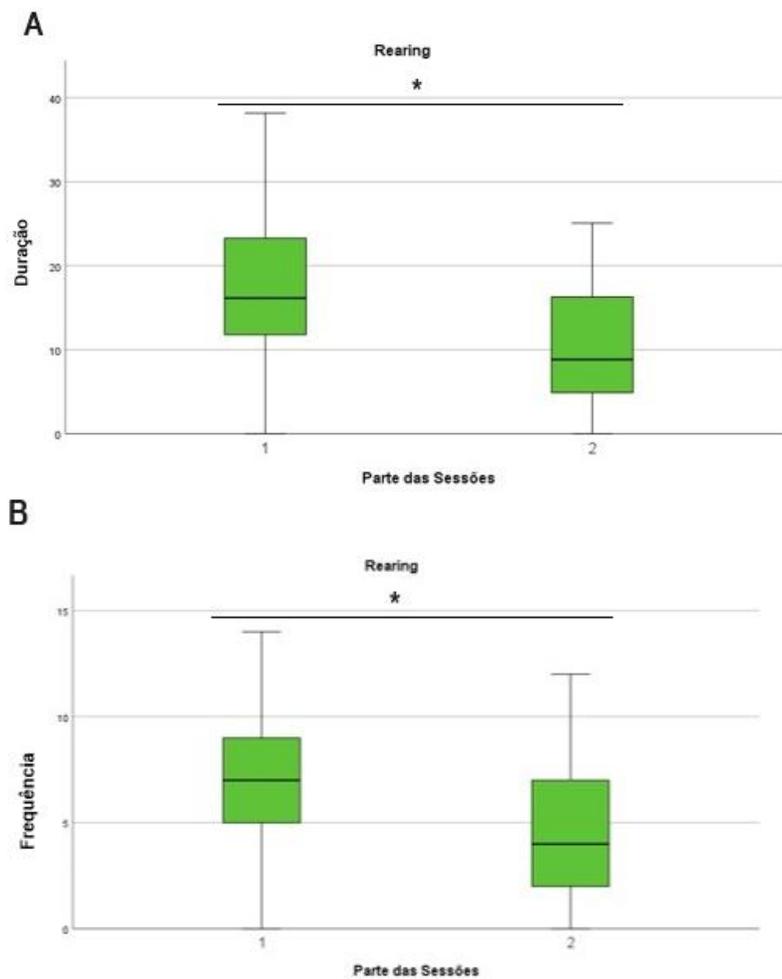


Figura 3 - Ocorrência de Rearing nos grupos TR+ e TR+T, apresentada em Duração (Figura 3A) e Frequência (Figura 3B) nas duas partes da sessão de treino.

A análise dos dados mostrou que o comportamento menos apresentado pelos animais foi o Freezing, onde 51 animais não o realizaram e 23 realizaram. Entre os 23 animais que o expressaram, a média do tempo de duração do comportamento foi de 17 segundos e 14 milésimos (DP 16,69) e a frequência de 2,17 episódios (DP 1,6). Para os grupos Tr+ e Tr+T, foi observada diferença significativa ($T=6$, $p < 0,05$) na frequência de Freezing entre as duas metades da sessão, sendo maior a frequência na parte 2 do que na parte 1 da sessão (a média da parte 1 foi de 0,16; DP:1,05; e a da parte 2 foi de 0,53; DP: 0,64) (Figura 4A). Esta diferença, porém, não foi encontrada para a duração do Freezing (Figura 4B). Este resultado indica que o comportamento de Freezing é obtido como resposta ao estímulo aversivo.

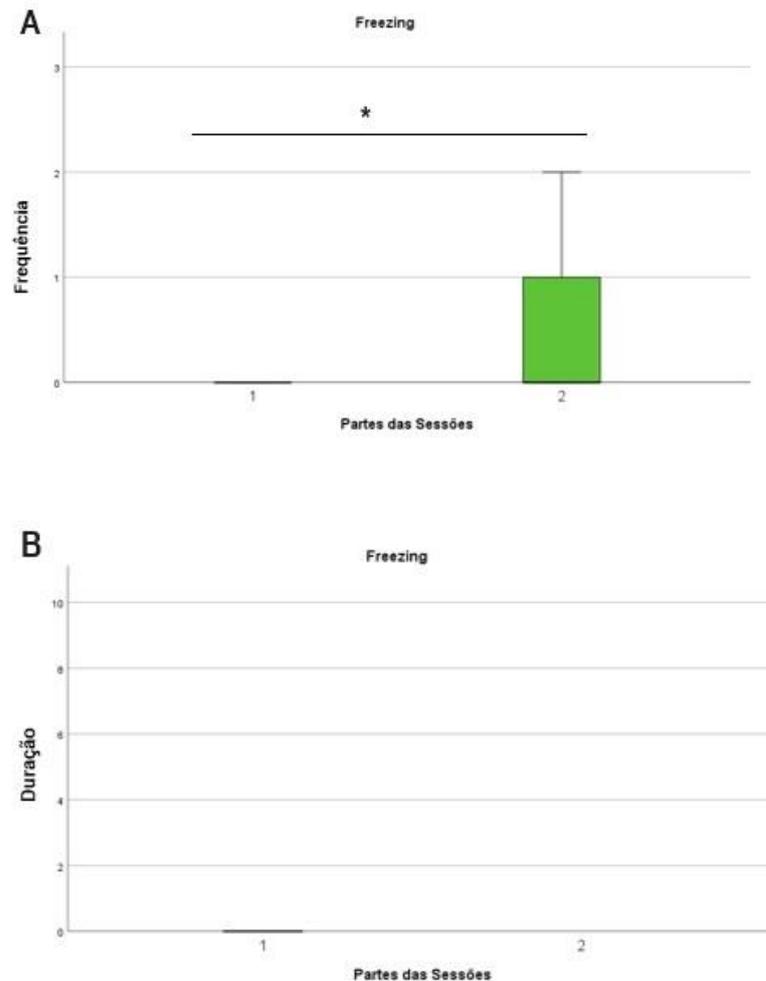


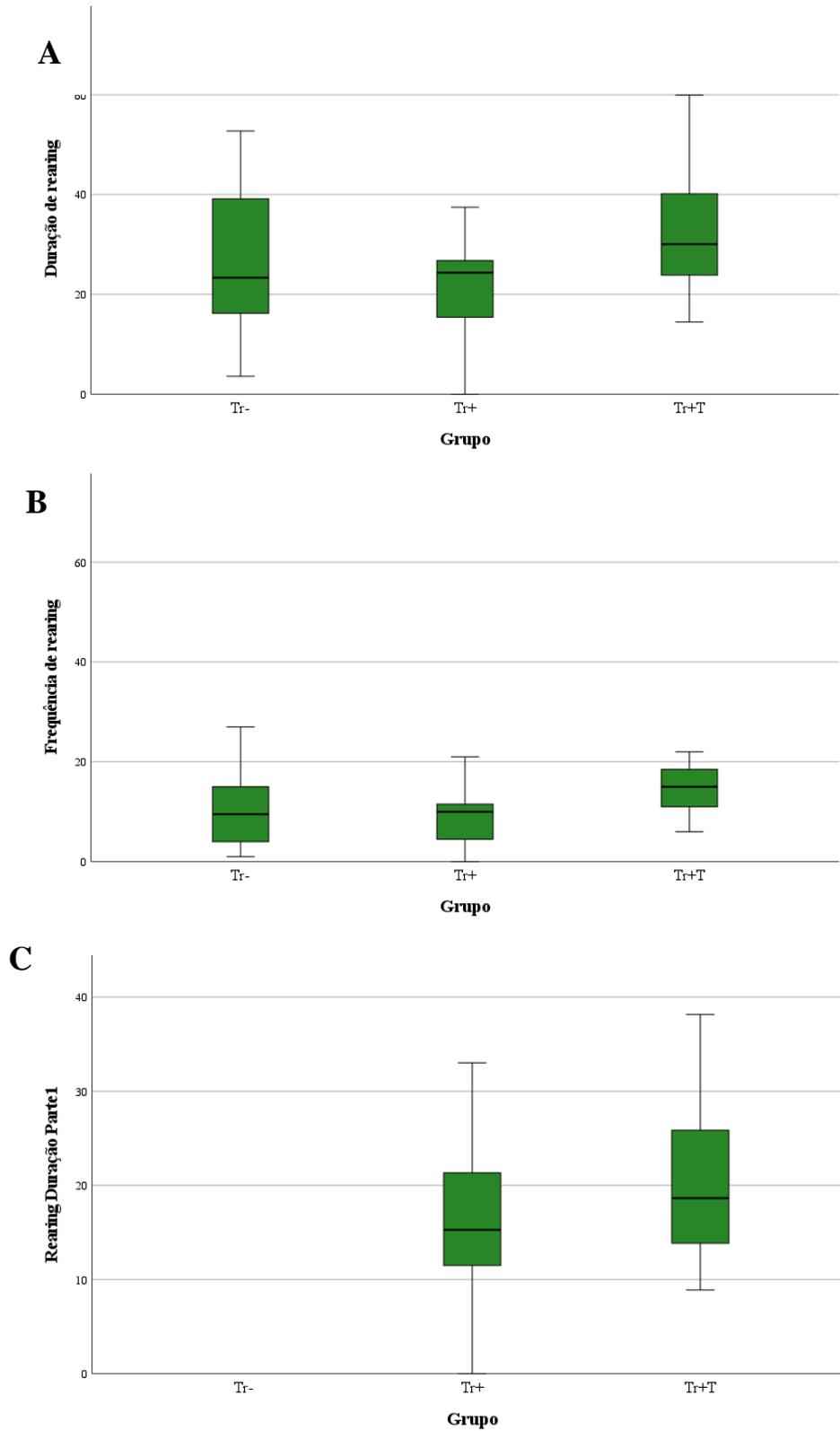
Figura 4 - Ocorrência de Freezing nos grupos TR+ e TR+T, expressa em Frequência (Figura 4A) e Duração (Figura 4B) nas duas partes da sessão de treino.

O teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon realizado para comparar a sessão de teste e a de treino para os animais do grupo Tr+T não apresentaram diferenças significativas entre estas duas sessões para nenhuma das variáveis referentes ao Freezing, onde $T = -1,87$ $p = 0,006$ para frequência e $T = -1,782$, $p = 0,075$ para duração e porcentagem de tempo em Freezing por sessão. Esses dados indicam que ratos com 24 dias de idade são capazes de evocar memória aversiva com intervalo de 24h.

5.2 Diferenças entre grupos

Apenas o comportamento de Rearing apresentou diferenças significativas entre os grupos. Foi verificada diferença na duração ($H = 8,4$; $p < 0,05$) (Figura 5A) e frequência ($H = 14,3$; $p < 0,001$) (Figura 5B) desse comportamento. Além disso, houve diferenças entre grupos para a frequência de Rearing na parte 1 da sessão de treino ($H = 12,5$; $p < 0,01$) (Figura 5C) e

para a duração ($H = 8,9$; $p < 0,05$) (Figura 5D) e frequência na parte 2 da sessão de treino ($H = 12,9$; $p < 0,01$) (Figura 5E).



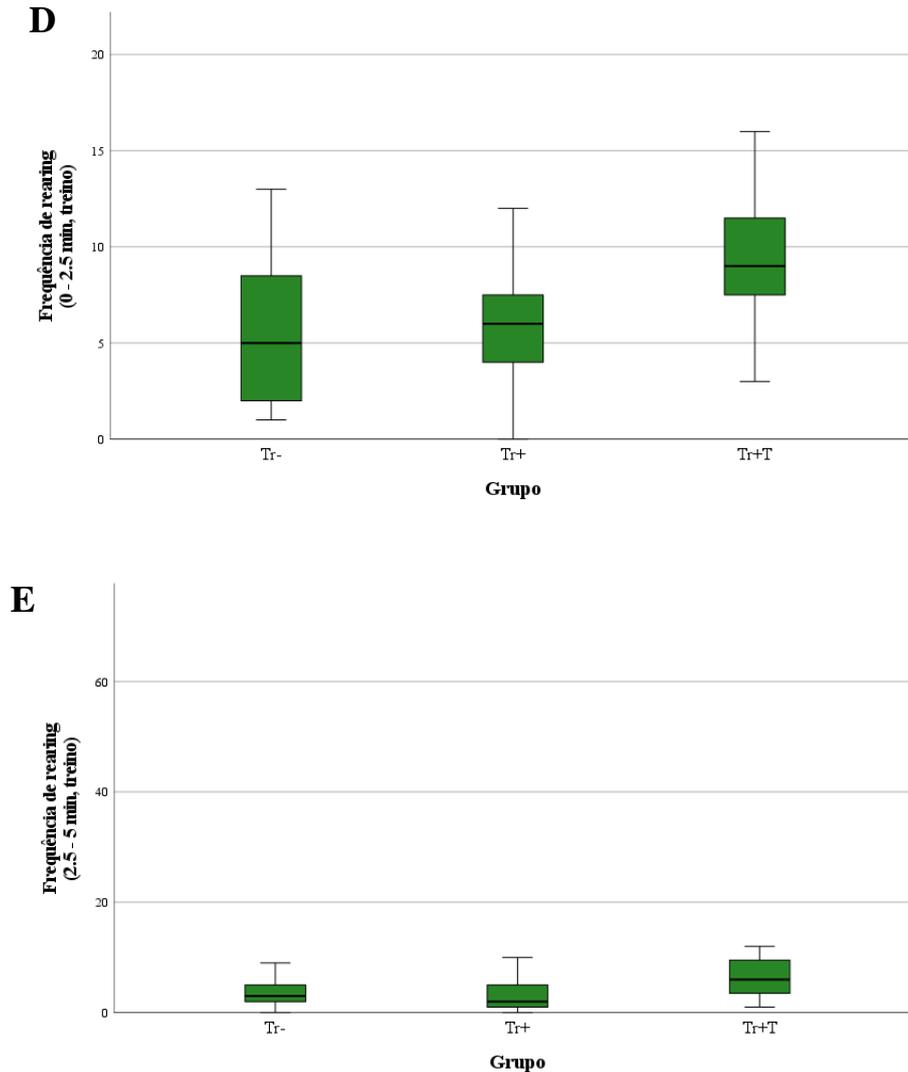


Figura 5 – Comportamento de Rearing entre grupos, apresentada em Duração (Figura 5A) e Frequência (Figura 5B) e para as duas partes da sessão de treino em Duração parte 1 (Figura 5C) e para Frequência na parte 1 (Figura 5D) e parte 2 (Figura 5E).

5.3 Diferenças Intragrupo referentes ao sexo

Também foram investigadas diferenças sexuais dentro dos grupos. Não houve resultado significativo para o grupo TR-. Para o grupo TR+ foi observado que as fêmeas realizaram mais Self-Grooming do que os machos na primeira parte do treino; resultado expresso tanto na duração ($U = 69.5, p < 0.05$) (Figura 6 A) como na frequência ($U = 62, p < 0.05$) (Figura 6B) deste comportamento. Por sua vez, o grupo TR+T apresentou um resultado significativo: os machos apresentaram maior latência para o Freezing do que as fêmeas na sessão de teste ($U = 2, p < 0.05$) (Figura 6C).

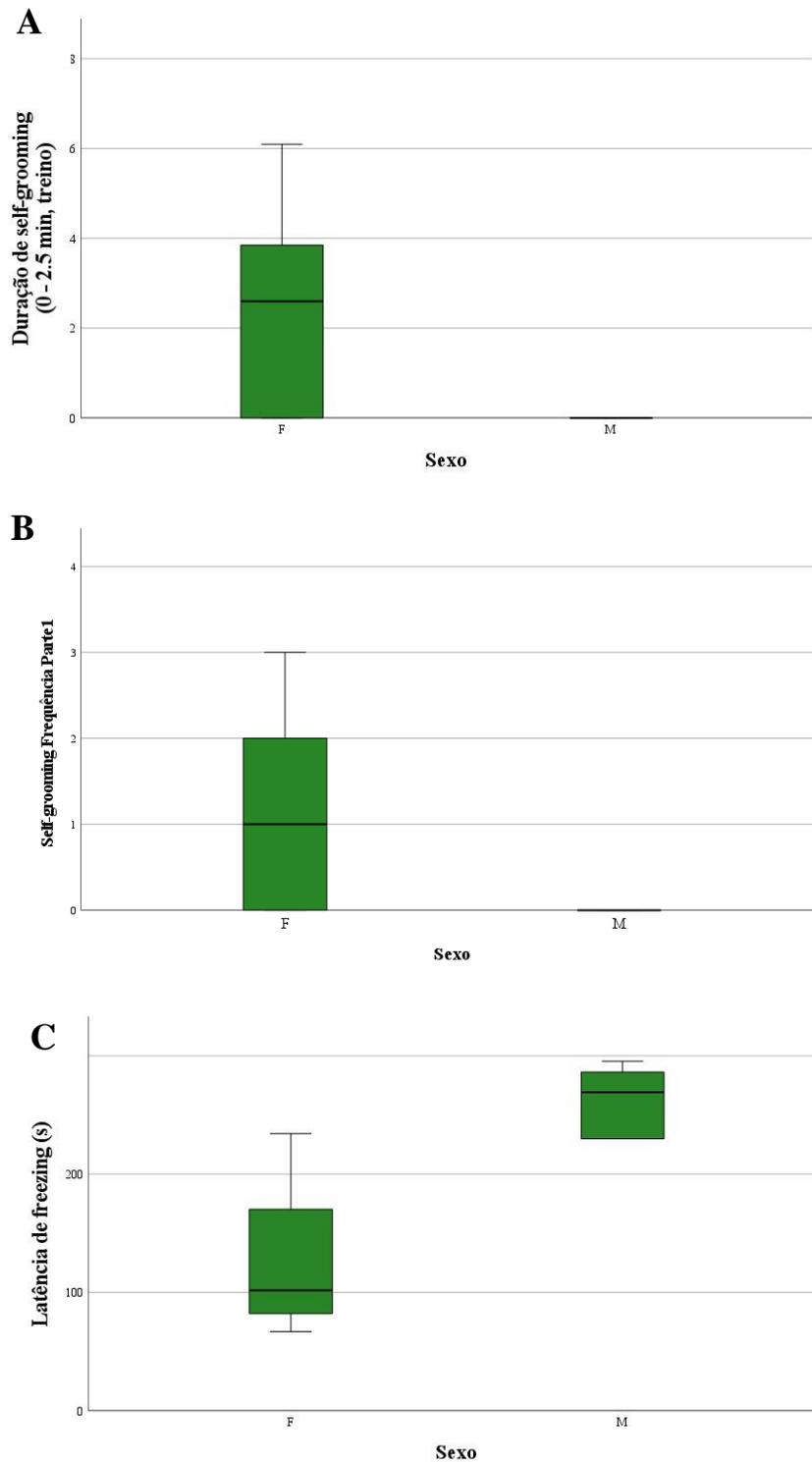
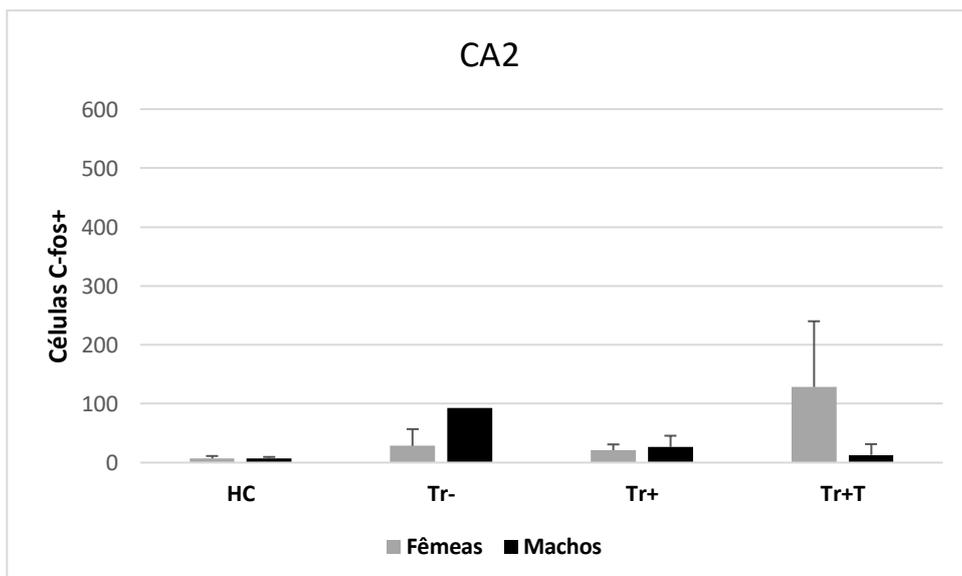
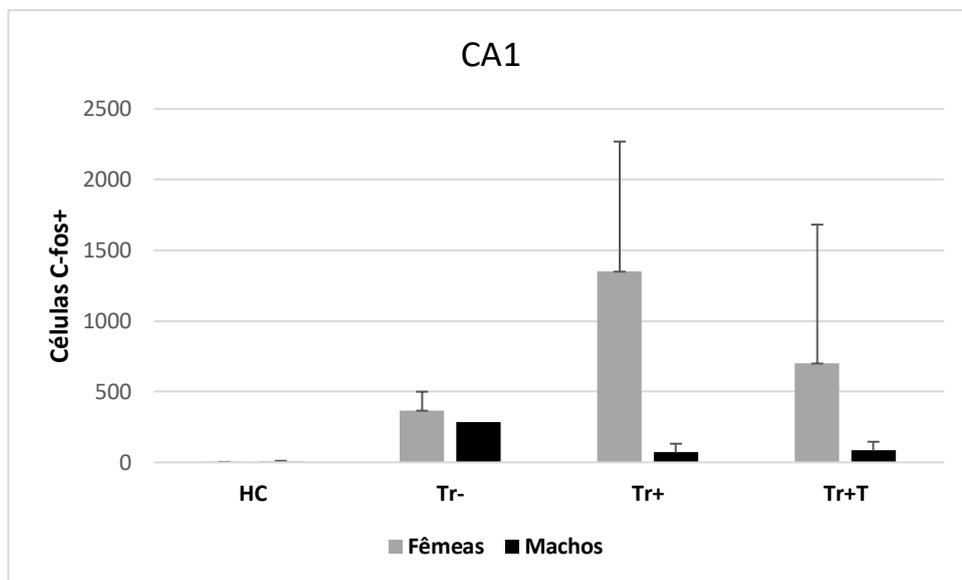


Figura 6 - Diferenças sexuais em ratos PND24 submetidos ao Condicionamento de Medo ao Contexto: fêmeas do grupo TR+ apresentam mais autolimpeza que os machos na sessão inicial de treino e fêmeas apresentam menor latência para o comportamento freezing na evocação da memória de medo.

5.4 Imunohistoquímica

Foram verificadas células reativas para C-fos e WFA em todo o hipocampo dorsal, em todos os grupos experimentais, e em ambos os sexos. Não foi utilizada estatística inferencial na análise dos dados provenientes da Imunohistoquímica, em função do reduzido tamanho amostral. Para cada grupo experimental, obtivemos a média e o desvio-padrão dos marcadores nas subáreas hipocâmpais, como demonstrado nas Figuras 7 e 8. A Figura 9 apresenta uma imagem representativa do cérebro de animal do grupo Home Cage, demonstrando a operacionalização da contagem celular.



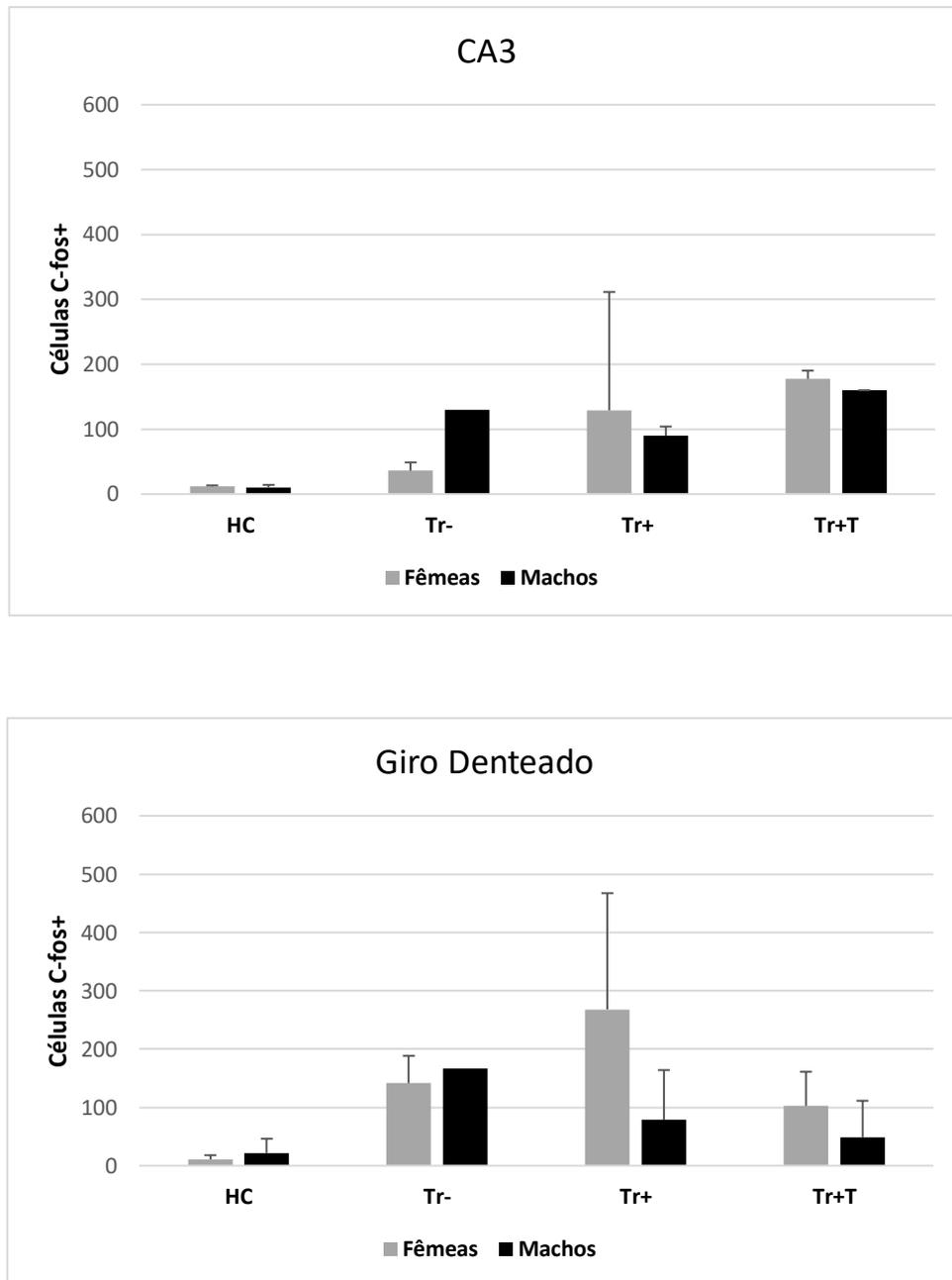
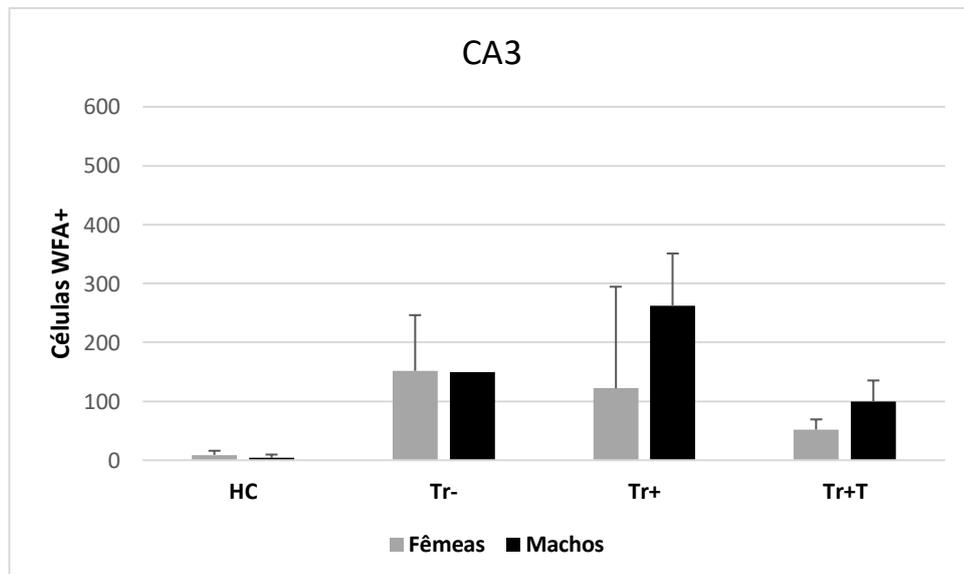
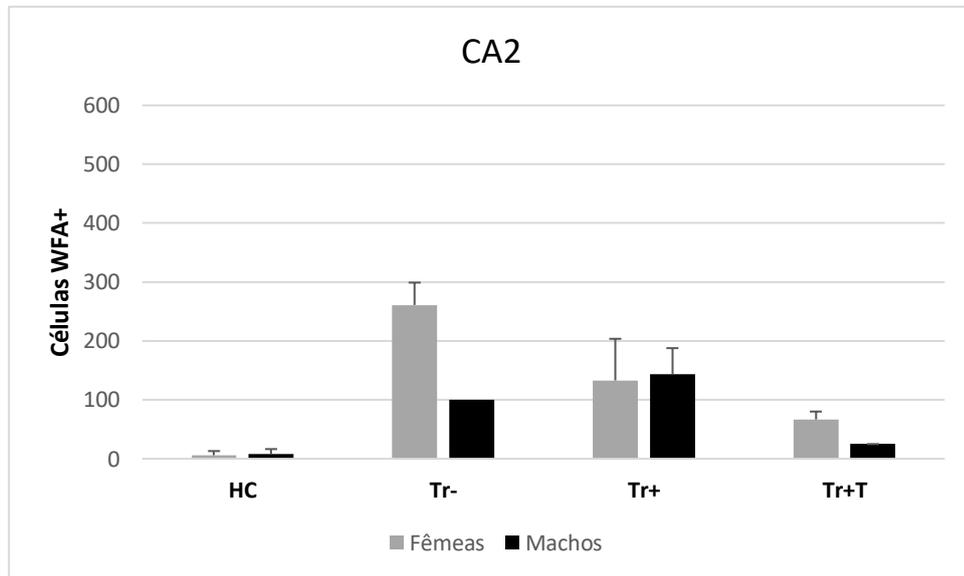
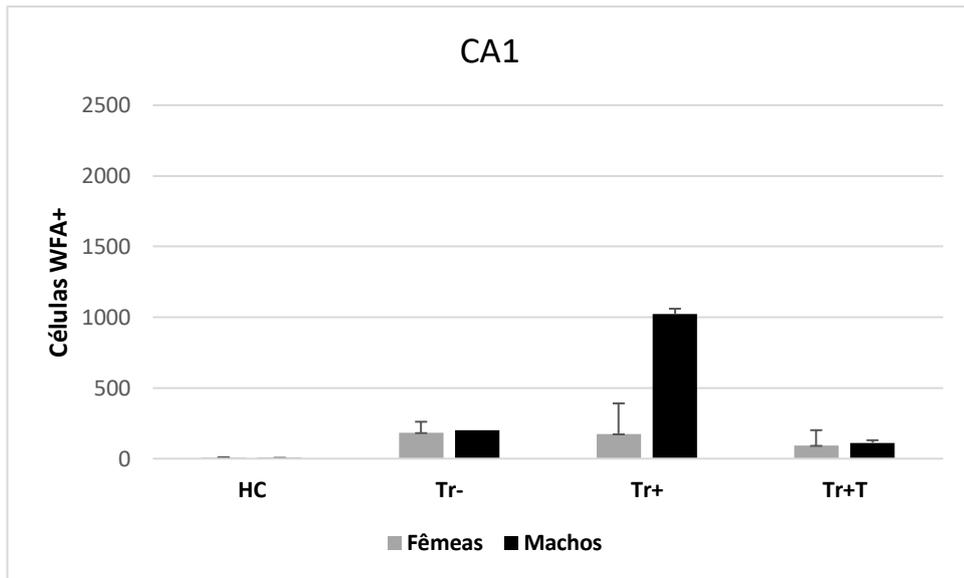


Figura 7 – Neurônios reativos a C-fos nas subáreas hipocâmpais dos grupos Home Cage, TR-, TR+ e TR+T, representados como média e desvio-padrão.



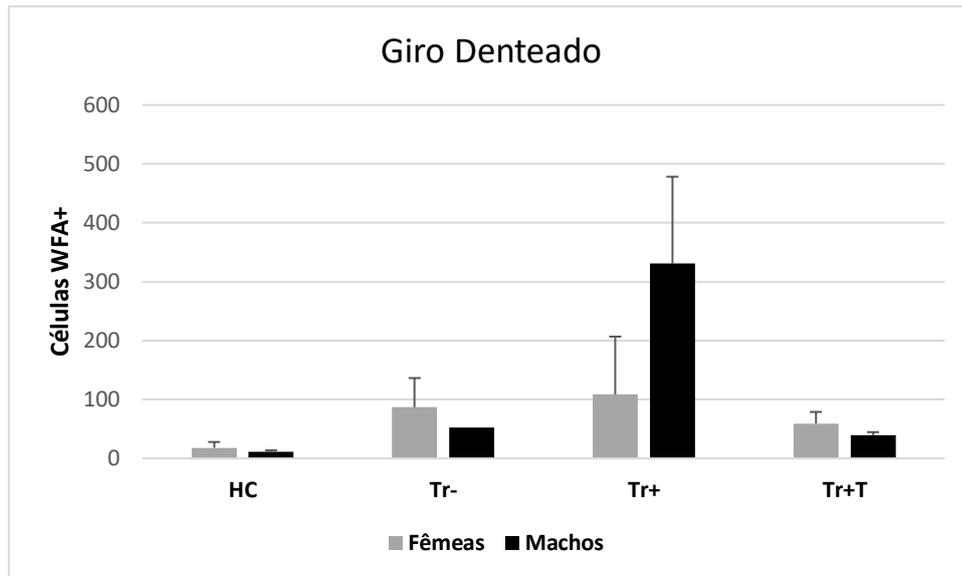


Figura 8 – Neurônios reativos a *Wisteria floribunda*, indicando a presença de redes perineuronais, nas subáreas hipocâmpais dos grupos Home Cage, TR-, TR+ e TR+T, representados como média e desvio-padrão.



Figura 9 – Imagem representativa do hipocampo dorsal de um animal do grupo Home Cage, apresentando a delimitação anatômica e destacando a visualização dos neurônios marcados para C-fos (azul) e PNNs (verde).

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho caracterizou as reações defensivas e o perfil de ativação e plasticidade no cérebro de ratos pré-púberes de ambos os sexos.

Utilizando a tarefa de condicionamento de medo ao contexto, foram registrados os comportamentos de self-grooming, rearing e freezing. O self-grooming não se mostrou informativo, uma vez que os grupos expostos ao choque exibiram, em média a mesma quantidade e duração de eventos de autolimpeza dentro e fora dos períodos de aplicação de estímulo aversivo no treino. Ressaltamos, porém, que em nosso trabalho, essa variável apresentou diferença exclusivamente no contexto de diferenças sexuais, em que as fêmeas do grupo TR+ apresentaram mais autolimpeza do que os machos no momento do teste em que não há choques. Considerando que Fernández-Teruel e Estanislau (2016) afirmam que este comportamento pode ser uma medida denotativa de ansiedade relacionada ao uso de ambientes novos, o resultado que encontramos deve estar indicando uma reatividade diferencial ao estresse neste sexo.

Em relação ao comportamento de rearing, mesmo havendo algumas diferenças intergrupo, em nosso trabalho este foi um dos comportamentos mais prevalentes. Observamos que os eventos de rearing e sua duração foram maiores na parte do treino sem a apresentação dos choques. Sabemos que a fase da adolescência é um momento marcado pela curiosidade nos roedores (Lin; Wilbrecht, 2022), assim os animais podem estar expressando este comportamento como uma forma de explorar um ambiente desconhecido (Goes et.al., 2013). Esta interpretação é apoiada pelo fato de que não realizamos habituação dos animais ao aparato em nosso estudo, e, além disso, o experimento foi conduzido durante a madrugada, o que corresponde a fase do dia em que os animais estão mais ativos. Por outro lado, o rearing, assim como o self-grooming, também é tido na literatura como um comportamento do tipo ansioso (Sturman, 2018), sendo necessários outros estudos para compreender adequadamente os comportamentos que ratos pré-púberes exibem no contexto da tarefa que foi aqui empregada.

O freezing é o principal indicador de reação imediata ao medo (LeDoux, 2014). Embora estudos apontem que ratos com 10 dias de idade já respondam ao protocolo de condicionamento de medo ao contexto (Landers; Sullivan, 2012), alguns pesquisadores mostraram redução de freezing em camundongos adolescente entre os 29 e 33 dias de vida, gerando uma lacuna quanto à ontogenia comportamental desta reação defensiva. Em nossa amostra, houve grande variação, pois nem todos os animais o apresentaram. Entretanto, nos

animais submetidos a choques, observamos que a frequência de freezing foi maior na parte do treino em que há a presença do estímulo aversivo, o que não ocorreu para o grupo TR-. Juntamente com a expressão de freezing pelos animais do grupo TR+T, ao serem reinsertos no aparato experimental 24 horas após o teste, estes resultados indicam que o freezing parece ser um correlato confiável tanto para codificação como para evocação de memória de medo. Este argumento é apoiado por Baker & Richardson (2015), Rainecki et al. (2010) e Santarelli e colaboradores (2018), que também registraram freezing em ratos no P24, e a variação obtida em nossa amostra pode se dever à menor intensidade de choques utilizada em nosso estudo, comparada à literatura (Santarelli et. al., 2018).

A segunda parte dos nossos resultados se refere à imunohistoquímica, em que foi utilizada a expressão do gene imediato C-fos e das redes perineuronais em Ca1, Ca2, Ca3 e GD do hipocampo dorsal. Ao compararmos as médias das células reativas a C-fos e WFA dos grupos experimentais com o grupo controle (Home Cage), podemos assumir que a ativação neuronal e a expressão de redes perineuronais decorreram, de fato, dos procedimentos experimentais.

C-fos é compreendido como um bom marcador de atividade celular, e nossos achados corroboram o fato de que o aprendizado de medo contextual é hipocampo-dependente em roedores desde o início da ontogênese (Travaglia et al., 2018); e verificamos ainda até mesmo a codificação do contexto (grupo TR+) recruta o hipocampo como um todo nesta idade, em ambos os sexos. Este dado confirma que, para esta modalidade de memória, o hipocampo de animais em P24 já apresenta algumas características funcionais similares aos adultos (Matus-Amat et al. 2004).

Ao observarmos os dados referentes às células reativas à WFA, parece haver menor modulação por redes perineuronais na fase de evocação comparada à fase de codificação, uma vez que a expressão no grupo TR+T apresentou menores médias que os demais grupos experimentais. Em nossas análises comportamentais, verificamos uma diferença sexual na forma de expressão do freezing na evocação da memória aversiva, em que os machos do grupo Tr+T apresentaram maior latência para exibir este comportamento do que fêmeas. Ao observamos o perfil de ambos os sexos nos dados de imunohistoquímica, na fase de codificação as fêmeas parecem apresentar maior ativação neuronal que os machos em praticamente todas as subáreas hipocâmpais, enquanto os machos deste grupo parecem expressar mais redes perineuronais que as fêmeas no hipocampo. De todo modo, em função do reduzido tamanho amostral, os dados referentes à imunohistoquímica não são conclusivos, e apenas demonstram possíveis direções, as quais devem ser consideradas em estudos futuros.

Desta forma, o nosso trabalho demonstrou que os ratos com 24 dias de vida respondem com o comportamento de freezing nos processos de aquisição e evocação de uma memória de medo ao contexto. Foi observada uma diferença sexual, em que as fêmeas apresentam maior prontidão em expressar freezing na fase de recuperação da memória. Verificamos também células imunoreativas à C-fos e WFA (indicativas da presença de redes perineuronais) em todo o hipocampo dorsal, em todos os grupos experimentais, e em ambos os sexos. É importante destacar que na idade aqui investigada (P24), os ratos ainda não entraram na puberdade, não tendo sido expostos ao aumento de hormônio gonadais que ocorre na adolescência, acarretando diferenças na morfologia e fisiologia do hipocampo ao longo do desenvolvimento (Premachandran et al., 2020); sabe-se que existem receptores para andrógenos e estrógenos no hipocampo (Premachandran et al., 2020). Assim sendo, seria interessante a realização de estudos similares ao nosso envolvendo outras janelas temporais na adolescência, abrangendo o período pré-púbere e pós puberdade (ou seja: após as idades pós-natal P35-P38).

7 CONCLUSÃO

O comportamento de Freezing continua sendo um bom indicador para a memória de medo contextual em ratos PND 24. A expressão do IEG C-fos e a ativação de PNNs são correlatos da estimulação aversiva, mesmo na presença de choques em frequência de 0,5 mA., sendo evidente que as áreas hipocâmpais dorsais (Ca1, Ca2, Ca3 e GD) participam desse processo. Torna-se importante a verificação desses resultados em ratos em outra fase da adolescência, para verificar as modificações que ocorrem após a exposição expressiva aos hormônios gonadais, em ambos os sexos.

8 REFERÊNCIAS

- Alberini, CM e Travaglia, A. (2017). *Amnésia infantil: um período crítico de aprender a aprender e lembrar*. *Jornal de Neurociências*, 37 (24), 5783-5795.
- Alme, M.N., Laroche, S., Bramham, C.R (2008). *Object-place recognition learning triggers rapid induction of plasticity-related immediate early genes and synaptic proteins in the rat dentate gyrus*. *Neural Plast.* 2008, 269097
- Baker, K. D., & Richardson, R. (2015). *Forming competing fear learning and extinction memories in adolescence makes fear difficult to inhibit*.
- Baddeley, Alan; Eysenck, Michael W.; Anderson, Michael C. *Memória* (2018). Comercial Grupo ANAYA, SA.
- Barbosa, F. F.; Silva, R. H. (2018) *Immediate-Early Gene Expression in Neural Circuits Related to Object Recognition Memory*. In *Handbook of Object Novelty Recognition*. Eds. Edited by Ennaceur & Souza Silva.
- Bear, Mark F.; Connors, Barry W.; Paradiso, Michael A (2002). *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. Artmed editora.
- Bear, Mark F.; Connors, Barry W.; Paradiso, Michael A (2017). *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. Artmed editora
- Beck, C. H., & Fibiger, H. C. (1995). *Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment*. *Journal of Neuroscience*, 15(1), 709-720.
- Bessières B., Jia M., Travaglia A. & Alberini C. M. (2019). *Developmental changes in plasticity, synaptic, glia and connectivity protein levels in rat basolateral amygdala*. *Learn.Mem.* 26, 436–448.
- Bessières, B., Alessio Travaglia, Todd M. Mowery, et al. (2020) *Early life experiences selectively mature learning and memory abilities*. *Nat Comm*, 11:628.
- Biobehav. Rev.* 36 (7), 1597–1608
- Bockhorst KH, Narayana PA, Liu R, et al. (2008). *Early postnatal development of rat brain: in vivodiffusion tensor imaging*. *Journal of Neuroscience Research*. 86:1520–1528.
- Boissy, Alain. (1995). "Fear and fearfulness in animals." *The quarterly review of biology* 70, no. 2 : 165-191.
- Brust et al. (2015): *Lifetime development of behavioural phenotype in the house mouse (Mus musculus)*. *Frontiers in Zoology*. 12 (Suppl 1):S17.

- Coleman, G., & Canal, M. M. (2017). *Postnatal light effects on pup stress axis development are independent of maternal behavior. Frontiers in Neuroscience, 11(FEB)*.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00046>
- Colon, L., Odynocki, N., Santarelli, A., & Poulos, A. M. (2018). *Sexual differentiation of contextual fear responses. Learning & Memory, 25(5), 230-240.*
- Corvetto, L.; Rossi, F (2005). *Degradation of chondroitin sulfate proteoglycans induces sprouting of intact purkinje axons in the cerebellum of the adult rat. J. Neurosci. 25, 7150–7158.*
- Crispim Junior, C. F., Pederiva, C. N., Bose, R. C., Garcia, V. A., Lino-de Oliveira, C., & Marino-Neto, J. (2012). *ETHOWATCHER: Validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. Computers in Biology and Medicine, 42(2), 257–264.* <https://doi.org/10.1016/j.compbimed.2011.12.002>
- Dalmaz, Carla & Alexandre Netto, Carlos (2004). *A memória. Ciência e Cultura, v. 56, n. 1, p. 30-31.*
- Dino, M.R.; Harroch, S.; Hockfield, S. & Matthews, R.T. (2006) *Monoclonal antibody Cat-315 detects a glycoform of receptor protein tyrosine phosphatase beta/phosphacan early in CNS development that localizes to extrasynaptic sites prior to synapse formation. Neuroscience. 142, 1055–1069.*
- Dobbing J, Sands J. (1979). *Comparative aspects of brain growth spurt. Early Human Development. 311:79–83.*
- Donato, C. (2020). *Lichtung Como Alvorada E Crepúsculo Ontológico.* Clube de Autores.
- Eichenbaum, H., Sauvage, M., Fortin, N., Komorowski, R., Lipton, P., 2012. *Towards a functional organization of episodic memory in the medial temporal lobe. Neurosci.*
- Fawcett, J. W., Fyhn, M., Jendelova, P., Kwok, J. C., Ruzicka, J., & Sorg, B. A. (2022). *The extracellular matrix and perineuronal nets in memory. Molecular Psychiatry, 27(8), 3192-3203.*
- Fernández-Teruel, A., & Estanislau, C. (2016). *Meanings of self-grooming depend on an inverted U-shaped function with aversiveness. Nature Reviews Neuroscience, 17(9), 591-591.*
- Frankland, P.W., Josselyn, S.A., & Kohler, S. (2019) *The neurobiological foundation of memory retrieval. Nature Neuroscience, 22, 1576–1585*
- Gao, A., Xia, F., Guskjolen, A. J. & Ramsaran, A. I., et al. (2018). *Elevation of Hippocampal Neurogenesis Induces a Temporally Graded Pattern of Forgetting of Contextual Fear Memories. The Journal of Neuroscience, 38.*
- Gibb, R. L., Environment. In: I.Q. Whishaw, B. Kolb. (2005). *The behavior of the laboratory rat: a handbook with tests*, Oxford University Press, Oxford; New York.

- Goes, T. C., Antunes, F. D., Almeida-Souza, T. H., Ursulino, F. R. C., Garcez, F. B., Melo, A. L. L., & Teixeira-Silva, F. (2013). *Comportamento de ratos Wistar no Paradigma da Exploração Livre*. In SCIENTIA PLENA (Vol. 9). www.scientiaplenu.org.br/124901-1
- Greenberg, Michael E & ZIFF, Edward B(1984). *Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene*. *Nature*, v. 311, n. 5985, p. 433-438.
- Hefner, K., & Holmes, A. (2007). *Ontogeny of fear-, anxiety- and depression-related behavior across adolescence in C57BL/6J mice*. *Behavioural Brain Research*, 176(2), 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.10.001>
- Heim, C., & Nemeroff, C. B. (2001). *The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies*. *Biological Psychiatry*, 49(12),1023–1039.
- Hunt, P. S., Burk, J. A., & Barnet, R. C. (2016). *Adolescent transitions in reflexive and non-reflexive behavior: Review of fear conditioning and impulse control in rodent models*. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 70, pp. 33–45). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.026>
- Jenkins, Trisha A. et al. (2003). *Distinct patterns of hippocampal formation activity associated with different spatial tasks: a Fos imaging study in rats*. *Experimental brain research*, v. 151, p. 514-523.
- Jia, M.; Travaglia, A.; Pollonini, G.; Fedele G. & Alberini, C.M. (2018) *Developmental changes in plasticity, synaptic, glia, and connectivity protein levels in rat medial prefrontal cortex*. *Learn. Mem.*
- Josselyn, S. A. & Frankland, P. W. (2012). *Infantile amnesia: A neurogenic hypothesis*. *Learning & Memory*, 19(9), 423-433.
- J Pokorny, T Yamamoto. (1981). *Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. II. Development of ultrastructure in stratum lacunosum and molecular* *Brain Res. Bull.*, 7, pp. 121-130.
- Junior, C. F. C., Pederiva, C. N., Bose, R. C., Garcia, V. A., Lino-de-Oliveira, C., & Marino-Neto, J. (2012). *ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals*. *Computers in biology and medicine*, 42(2), 257-264.
- Juraska, J. M., & Willing, J. (2017a). *Pubertal onset as a critical transition for neural development and cognition*. In *Brain Research* (Vol. 1654, pp. 87–94). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.012>
- Juraska, J. M., & Willing, J. (2017b). *Pubertal onset as a critical transition for neural development and cognition*. In *Brain Research* (Vol. 1654, pp. 87–94). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.012>

- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., Song, C., Berridge, K. C., Graybiel, A. M., & Fentress, J. C. (2016). *Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience*. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), 45-59.
- Kinnavane, L., Albasser, M. M., & Aggleton, J. P. (2015). *Advances in the behavioural testing and network imaging of rodent recognition memory*. *Behavioural brain research*, 285, 67-78.
- Lanahan A, Worley P. (1998) *Immediate-early genes and synaptic function*. *Neurobiol Learn Mem*.
- Landers, M. S., & Sullivan, R. M. (2012). *The development and neurobiology of infant attachment and fear*. *Developmental neuroscience*, 34(2-3), 101-114.
- Lau, L. W., Cua, R., Keough, M. B., Haylock-Jacobs, S., & Yong, V. W. (2013). *Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination*. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(10), 722-729.
- Ledoux, Joseph. (1998). *Fear and the brain: where have we been, and where are we going?* *Biological psychiatry*, v. 44, n. 12, p. 1229-1238.
- Ledoux, Joseph E. (2000) *Emotion circuits in the brain*. *Annual review of neuroscience*, v. 23, n. 1, p. 155-184.
- Ledoux, Joseph E. (2014) *Coming to terms with fear*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 8, p. 2871-2878.
- Li, S., Callaghan, B. L., & Richardson, R. (2014). *Infantile amnesia: forgotten but not gone*. *Learning & Memory*, 21(3), 135-139.
- Lin, W. C., & Wilbrecht, L. (2022). *Making sense of strengths and weaknesses observed in adolescent laboratory rodents*. *Current Opinion in Psychology*, 45, 101297.
- Maren, Stephen (2001). *Neurobiology of Pavlovian fear conditioning*. *Annual review of neuroscience*, v. 24, n. 1, p. 897-931.
- Matus-Amat, P., Higgins, E. A., Barrientos, R. M., & Rudy, J. W. (2004). *The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations*. *Journal of Neuroscience*, 24(10), 2431-2439.
- Miyata, S., Nadanaka, S., Igarashi, M., & Kitagawa, H. (2018). *Structural variation of chondroitin sulfate chains contributes to the molecular heterogeneity of perineuronal nets*. *Frontiers in integrative neuroscience*, 12, 3.
- Nikolaev, Evgeni et al. (2002). *Environmental manipulation differentially alters c-Fos expression in amygdaloid nuclei following aversive conditioning*. *Brain Research*, v. 957, n. 1, p. 91-98.
- Panksepp, J. (1990) "The psychoneurology of fear: Evolutionary perspectives and the role of animal models in understanding human anxiety." *Handbook of anxiety* 3: 3-58.

- Park, C. H. J., Ganella, D. E., & Kim, J. H. (2017). *Juvenile female rats, but not male rats, show renewal, reinstatement, and spontaneous recovery following extinction of conditioned fear*. *Learning & Memory*, 24(12), 630-636.
- Piekarski, D. J., Johnson, C. M., Boivin, J. R., Thomas, A. W., Lin, W. C., Delevich, K., Galarce, E. M., & Wilbrecht, L. (2017). *Does puberty mark a transition in sensitive periods for plasticity in the associative neocortex?* In *Brain Research* (Vol. 1654, pp. 123–144). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.08.042>.
- Pokorný, J.; Ymamamoto, T.(1981). *Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats*. I. Development of dendritic arborisation in pyramidal neurons. *Brain research bulletin*, v. 7, n. 2, p. 113-120.
- Premachandran, H., Zhao, M., & Arruda-Carvalho, M. (2020). *Sex Differences in the Development of the Rodent Corticolimbic System*. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.583477>
- Raineki, C., Moriceau, S., & Sullivan, R. M. (2010). *Developing a Neurobehavioral Animal Model of Infant Attachment to an Abusive Caregiver*. *Biological Psychiatry*, 67(12), 1137–1145. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.12.019>
- Reh, R. K., Dias, B. G., Nelson III, C. A., Kaufer, D., Werker, J. F., Kolb, B. & Hensch, T. K. (2020). *Critical period regulation across multiple timescales*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(38), 23242-23251.
- Rice D, Barone S Jr. (2000). *Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models*. *Environment Health Perspective* 108:511–533.
- Romeo RD, Richardson HN & Sisk CL(2002): *Puberty and the maturation of the male brain and sexual behavior: recasting a behavioral potential*. *Neurosci Biobehav Rev*, 26:381-391.
- Rudy, J. W. (2009). *Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system*. In *Learning and Memory* (Vol. 16, Issue 10, pp. 573–585). <https://doi.org/10.1101/lm.1494409>.
- Santarelli, A. J., Khan, A. M., & Poulos, A. M. (2018). *Contextual fear retrieval-induced Fos expression across early development in the rat: An analysis using established nervous system nomenclature ontology*. *Neurobiology of Learning and Memory*, 155, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.05.015>
- Saroja, S. R., Sase, A., Kircher, S. G., Wan, J., Berger, J., Höger, H., ... & Lubec, G. (2014). *Hippocampal proteoglycans brevican and versican are linked to spatial memory of Sprague–Dawley rats in the morris water maze*. *Journal of neurochemistry*, 130(6), 797-804
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., et al. (2013). *Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species*. *Prog. Neurobiol.* 106, 1–16.

- Sheng, M., Greenberg, M.E., 1990. *The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system*. Neuron 4, 477-485. Soule, J., Penke, Z., Kanhema, T.
- Squire, Larry R. & Zola, Stuart M (1996). *Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems*. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 93, n. 24, p. 13515-13522.
- Sturman, O., Luc Germain, P., & Bohacek, J. (2018). Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. Stress, 21(5), 443–452.
- Sunayana B. Banerjee, Vanessa A. Gutzeit, Justin Baman, Hadj S. Aoued, Nandini K. Doshi, Robert C. & Liu, Kerry J. (2017) *Ressler, Perineuronal Nets in the Adult Sensory Cortex Are Necessary for Fear Learning*. Neuron, 95.
- Smith EFS (1991): *The influence of nutrition and postpartum mating on weaning and subsequent play-behaviour in hooded rats*. Anim Behav, 41:513-524.
- Steimer, Thierry (2002). "The biology of fear-and anxiety-related behaviors." Dialogues in clinical neuroscience 4, no. 3: 231-249.
- Terranova ML, Laviola G (1995): *Individual differences in mouse behavior development – effects of precocious weaning and ongoing sexual segregation*. Anim Behav, 50:1261-1271.
- Tulving, E. e Markowitsch, HJ (1998) *Episódico e declarativo memória: papel do hipocampo* Hipocampo 8, 198-204
- Tulving, Endel (2002). *Memória episódica: da mente ao cérebro*. Revisão anual de psicologia, v. 53, n. 1, pág. 1-25.
- Vann, S.D., Brown, M.W., Erichsen, J.T., Aggleton, J.P.(2000) *Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests*. J. Neurosci. 20, 2711-2718.
- Wang, D., & Fawcett, J. (2012). *The perineuronal net and the control of CNS plasticity*. Cell and tissue research, 349, 147-160.
- Workman, A.D.; C.J. Charvet, B. Clancy, R.B. Darlington, B.L. (2013) *Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species*. J. Neurosci., 33 pp. 7368-7383.
- Zimmermann, K., Richardson, R., & Baker, K. (2019) *Maturational Changes in Prefrontal and Amygdala Circuits in Adolescence: Implications for Understanding Fear Inhibition during a Vulnerable Period of Development*. Brain Sciences.

ANEXO A - Parecer aprovado pela Comissão Ética no Uso de Animais



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "CODIFICAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO EM RATOS", protocolada sob o CEUA nº 2502280121 (ID 001306), sob a responsabilidade de **Flávio Freitas Barbosa e equipe**; *Ywlliane da Silva Rodrigues Meurer; Rochele Vasconcelos Castelo Branco Mourão; Karen Cristina Pugliane ; Rafaella Ellen de Andrade Marinho; ANA PAULA DE CASTRO ARAUJO; Jeanderson Soares Parente* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 26/03/2021.

We certify that the proposal "FEAR ENCODING ENCODING ACROSS DEVELOPMENT IN RATS", utilizing 90 Heterogenics rats (30 males and 60 females), protocol number CEUA 2502280121 (ID 001306), under the responsibility of **Flávio Freitas Barbosa and team**; *Ywlliane da Silva Rodrigues Meurer; Rochele Vasconcelos Castelo Branco Mourão; Karen Cristina Pugliane ; Rafaella Ellen de Andrade Marinho; ANA PAULA DE CASTRO ARAUJO; Jeanderson Soares Parente* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 03/26/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2021** a **03/2024**

Área: **Psicologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 3 meses**

N: **30**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **200 a 250 g**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 3 meses**

N: **60**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **200 a 250 g**

Local do experimento: As tarefas comportamentais serão realizadas entre 8h e 14h do dia de experimento na sala de experimentação do Laboratório de Estudos em Memória e Cognição (LEMCOG), localizado no Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes da UFPB. Os procedimentos de perfusão, microtomia e análise imuno-histoquímica serão realizados no Laboratório de Psicofarmacologia localizado no IPeFarm.

João Pessoa, 26 de março de 2021

Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba