



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

JOÃO EDUARDO CONCEIÇÃO MELO

**INFLUÊNCIA DA OCITOCINA HIPOCAMPAL, DURANTE A
AQUISIÇÃO, CONSOLIDAÇÃO E EVOCAÇÃO DE UMA
MEMÓRIA AVERSIVA EM RATAS**

**SÃO CRISTOVÃO – SE
2024**

	<p>João Eduardo Conceição Melo INFLUÊNCIA DA OCITOCINA HIPOCAMPAL DURANTE A AQUISIÇÃO, CONSOLIDAÇÃO E EVOCAÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA EM RATAS 2024</p>
--	---

JOÃO EDUARDO CONCEIÇÃO MELO

**INFLUÊNCIA DA OCITOCINA HIPOCAMPAL,
DURANTE A AQUISIÇÃO, CONSOLIDAÇÃO E
EVOCAÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA EM
RATAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Katty Anne Amador de Lucena Medeiros

SÃO CRISTOVÃO – SE

2024

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

M528i Melo, João Eduardo Conceição
Influência da ocitocina hipocampal, durante a aquisição,
consolidação e evocação de uma memória aversiva em ratas /
João Eduardo Conceição Melo ; orientador José Ronaldo dos
Santos. – São Cristóvão, SE, 2024.
132 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade
Federal de Sergipe, 2024.

1. Hormônios hipotalâmicos. 2. Estro. 3. Medo. 4. Ocitocina. 5.
Memória. I. Santos, José Ronaldo dos, orient. II. Título.

CDU 612.018

JOÃO EDUARDO CONCEIÇÃO MELO

**INFLUÊNCIA DA OCITOCINA HIPOCAMPAL,
DURANTE A AQUISIÇÃO, CONSOLIDAÇÃO E
EVOCAÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA EM
RATAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Katty Anne Amador de Lucena Medeiros

1º Examinador: Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo

2º Examinador: Prof. Dr. Felipe Porto Fiuza

3º Examinador: Profa. Dra. Alessandra Mussi Ribeiro

4º Examinador: Profa. Dra. Jéssica Maria Dantas Araújo Aragão

SÃO CRISTOVÃO – SE

2024

AGRADECIMENTOS

Após estes quatro anos de trabalho, nesse momento de grande alegria, venho fazer esse singelo agradecimento a todos que caminharam comigo neste período.

Primeiramente gostaria de agradecer a meu grande amigo JC (Jesus Cristo), a Ele agradeço principalmente pela minha vida e saúde e por me mandar pessoas e palavras assertivas, justamente quando eu mais precisava destas e que me fortaleceram nos obstáculos que surgiram ao longo desses anos.

Agradeço ainda aos meus pais Germano e Evani, por ao longo de minha história sempre me apoiarem em meus estudos e por vezes se preocuparem quando estou passando da conta. A eles agradeço por me criarem para ser o ser humano íntegro que sou hoje. Ainda em família, não posso esquecer de meus irmãos Victor e Lorena que sempre me incentivam quando estou mais pra baixo e sempre puxam minhas orelhas quando é preciso. Amo todos vocês.

Não posso falar de família, sem comentar da que estou começando junto com minha esposa Renata (Galega) que ao longo desse processo muito aturou minhas inseguranças e preocupações, sempre me incentivando a seguir em frente e me lembrando que “vai dar tudo certo”, obrigado por todo apoio galega, amo você “fia”.

Agradeço ainda a todos os meus familiares por estarem sempre torcendo por mim e me incentivando na busca do estudo.

Agradeço a meu amigo, orientador e pai científico o prof. Dr. José Ronaldo dos Santos (Chefe) por todos os ensinamentos, acadêmicos e pessoais, que me ajudou a construir desde 2014 quando começamos a trabalhar juntos que hoje formam o profissional que me tornei. Quem poderia imaginar que aquele aluno que surgiu do nada na aula de metodologia científica criticando métodos de seleção de alunos hoje estaria defendendo um doutorado, isso nunca me passou pela cabeça anos antes, mas as portas que você mostrou me fizeram ver mais longe e com isso tento buscar novos caminhos. Obrigado por ter acreditado em mim ao longo desses 10 anos, serei eternamente grato por tudo chefe. Ainda sobre a chefia, não posso esquecer de minha coorientadora a prof. Dra. Katty Anne Amador de Lucena Medeiros (Keiri) que junto com o Chefe são meus padrinhos de casamento. Gostaria de agradecer por ter me acompanhado ao longo deste processo, me acalmando quando me encontrei

aperriado e me apertando também quando necessário, sempre na medida certa (risos). Te agradeço de verdade por todos os conselhos e indicações que me auxiliaram durante todo o doutorado.

A ciência não se faz sozinha e aqui não foi diferente. Para o desenvolvimento do projeto contei com ajuda de pessoas que foram fundamentais para o resultado que temos hoje. O Heitor (Reitor), Thiago (Saruê) e o Rodolfo (Borracha), foram os que inicialmente desenvolveram o projeto junto comigo. Reitor sempre foi mais que um amigo, um friend, que me acompanhou do início ao fim nessa jornada, sempre sendo um cara disposto a ajudar, sendo para mim a voz da razão quando algo acontecia como esperado, muito obrigado por tudo irmão. O Saruê é claramente a pessoa mais zen que conheço e sempre foi muito aberto a me ajudar, sempre passando essa sensação de paz a todos ao redor, que pra mim sempre foi muito bem-vinda, vlw parceiro. O Borracha talvez seja meu amigo mais velho nessa UFS, desde o início da graduação sempre fomos bons amigos e ele com seu jeito extrovertido, sempre foi um exemplo de como um professor deve cativar a atenção de um aluno e isso me moveu a tentar ser mais dessa forma também, que com certeza me ajudou a chegar ao nível de aula que dou hoje. Basicamente todas as coisas mudam, e por vezes a equipe tende a mudar também. Com a saída de alguns por N motivos, outros igualmente capacitados se uniram a mim. Edson (little Edsan), Mylaine (Mm), Leo, Ana (Anitta), Camila (Moral) e Micaelle (Maria), foram pessoas sensacionais que me deram todo o suporte necessário para continuar a execução do projeto, sem estas, com certeza eu não conseguiria finalizar o presente trabalho, agradeço de coração a todos pelo apoio emocional.

Falando em equipe de trabalho, aproveito para estender a todos os demais integrantes da grande família LaNCE, que direta ou indiretamente me auxiliaram durante o processo, agradeço pela disponibilidade de todos. Aqui gostaria de deixar um agradecimento aparte para Auderlan (Derlan). Desde minha entrada no laboratório sempre tive Derlan como referência de aluno da pós a ser seguido e isso sempre me incentivou a tentar ser melhor. Hoje ele deixou de ser uma referência de aluno para mim pois junto com o Chefe e Keiri, passou a ser referência de profissional que almejo ser.

Claro que eu não poderia esquecer do pessoal do “Rolê aleatório”, o grupo formado por mim, Keri e Thassy (Krysthinna). Se tem pessoas que ouviram minhas loucuras ao longo desse doutorado foram essas 2 moças. Krysthinna sempre soube o que falar,

simples assim. Sempre me aconselhou para o bem, sempre me corrigiu para o bem, sempre me direcionou para o correto mesmo que eu achasse ruim (no fundo eu sabia que estava errado (risos)), da mesma forma que quando certo, me incentivava a continuar, a não desistir. Já Keiri sempre foi muito prestativa, alegre e sempre muito positiva. Essa positividade sempre me fez muito bem. Quantas vezes a vida e suas surpresas me abateram, mas Keiri estava ali: “isso é normal”, “isso acontece”, “é assim mesmo”. Por esses, e muitos outros motivos agradeço muito a essas moças.

Agradeço também a Universidade Federal de Sergipe e a todos que fazem parte dela, por ter me proporcionado a estrutura (física e humana) necessária para que eu pudesse crescer academicamente e pessoalmente, desde a graduação até hoje.

Agradeço ainda ao PROCFIS e todos os professores do programa, em especial aos professores que disponibilizaram seus horários para participaram das bancas PROASAs, o prof. Dr. Enilton Camargo e o prof. Dr. Julián Tejada, bem como para a banca de qualificação onde o prof. Dr. Felipe Fiuza fez parte juntamente com os já citados.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

RESUMO

Influência da ocitocina hipocampal, durante a aquisição, consolidação e evocação de uma memória aversiva em ratas. João Eduardo Conceição Melo, São Cristóvão-SE, 2024.

O estudo da memória, possibilitou compreender os mecanismos envolvidos na formação desta, além de possibilitar inferências sobre modulações das mesmas no tratamento de psicopatologias. Dentre os tratamentos, a modulação farmacológica tem destaque, visto a possibilidade de alterar a neurofisiologia da memória e do medo. Nesta perspectiva, o hormônio ocitocina tem ganhado destaque por causar mudanças comportamentais frente estímulos aversivos. Diante disso, nosso objetivo foi avaliar a influência da ocitocina hipocampal, durante a formação de uma memória aversiva em ratas. Para isso, utilizamos animais da linhagem Wistar, fêmeas. Estas, passaram por cirurgia estereotáxica para alocação de cânulas com dois dias de repouso absoluto após o procedimento e mais cinco dias de monitoramento do ciclo estral e após isso foram avaliados na tarefa de labirinto em cruz modificado. O estudo foi dividido em quatro experimentos, com dois grupos cada [Controle (CTL) e ocitocina (OXY)] que receberam uma única administração da ocitocina ou da solução veículo (0,5 uL da substância por hemisfério no hipocampo [2 µg/µL]). No primeiro experimento a administração ocorreu 20 minutos antes da etapa de treino, no segundo a ocorreu exatamente após a fase de treino, no terceiro foi realizada 20 minutos antes do teste e o quarto experimento, semelhante ao primeiro, foi administrada a ocitocina ou veículo 20 minutos antes do treino, mas neste, após 1 hora os animais foram perfundidos para a realização da imunorreatividade para C-fos. Nossos resultados revelaram que no experimento 1, OXY apresenta diminuição da aprendizagem da tarefa na fase de treino se comparado a CTL, explorando mais o braço aversivo ($p=0,04$), além de passar mais tempo para aprender a tarefa ($p=0,006$ para OXY e $p=0,03$ para CTL). Vimos ainda que grupo OXY nos 3 experimentos apresentou diminuição da resposta aversiva se comparado a CTL, visto a não diferença na permanência no braço aversivo se comparado ao seguro na fase de teste enquanto que CTL continuou a evitar o braço aversivo [CTL: $p=0,002$, $p=0,008$, $p=0,04$ (experimentos 1, 2 e 3 respectivamente)]. Vimos ainda que no experimento 1 a ocitocina favoreceu o enfrentamento de situações aversivas visto o maior tempo de permanência no braço aversivo no treino se comparado a CTL ($p=0,04$), semelhante ao visto no experimento 3 na fase de teste ($p<0,0001$). Na atividade motora, não foram observadas alterações no parâmetro. Na análise de C-fos verificamos que nas regiões CA3 e Giro denteado do hipocampo foi possível verificar efeito do tratamento com ocitocina no aumento da imunorreatividade ($p=0,03$ e $p=0,01$ respectivamente), além do córtex cingulado anterior também com aumento ($p=0,04$) e amígdala central que apresentou diminuição do parâmetro para os animais OXY ($p=0,04$). Já para a região CA1, amígdala basolateral, córtex pré-límbico e infralímbico não houve efeito do tratamento sobre a imunorreatividade ($p=0,07$, $p=0,36$, $p=0,37$ e $p=0,07$ respectivamente). O presente estudo destaca os efeitos da administração da ocitocina na diminuição de respostas aversivas. Os achados do presente trabalho, sugerem que a ocitocina pode modular o sistema límbico, fornecendo melhor compreensão sobre o funcionamento do mesmo sobre memórias aversivas.

Palavras-chave: Hormônios hipotalâmicos; Medo; Estereotaxia; Resposta comportamental.

ABSTRACT

Influence of hippocampal oxytocin during the acquisition, consolidation and recall of an aversive memory in rats. João Eduardo Conceição Melo, São Cristóvão-SE, 2024.

The study of memory made it possible to understand the mechanisms involved in its formation, in addition to enabling inferences about its modulations in the treatment of psychopathologies. Among the treatments, pharmacological modulation stands out, given the possibility of altering the neurophysiology of memory and fear. From this perspective, the hormone oxytocin has gained prominence for causing behavioral changes when faced with aversive stimuli. Therefore, our objective was to evaluate the influence of hippocampal oxytocin during the formation of an aversive memory in rats. For this, we used female Wistar animals. These underwent stereotactic surgery to allocate cannulas with two days of absolute rest after the procedure and another five days of monitoring the estrous cycle and after that they were evaluated in the modified plus maze task. The study was divided into four experiments, with two groups each [Control (CTL) and oxytocin (OXY)] that received a single administration of oxytocin or vehicle solution (0.5 μL of the substance per hemisphere in the hippocampus [$2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$]). In the first experiment, administration occurred 20 minutes before the training phase, in the second it occurred exactly after the training phase, in the third it was carried out 20 minutes before the test and in the fourth experiment, similar to the first, oxytocin or vehicle 20 was administered. minutes before training, but after 1 hour the animals were perfused to perform immunoreactivity for C-fos. Our results revealed that in experiment 1, OXY showed a decrease in learning the task in the training phase compared to CTL, exploring the aversive arm more ($p=0.04$), in addition to spending more time learning the task ($p_5=0.006$ for OXY and $p_3=0.03$ for CTL). We also saw that group OXY in the 3 experiments showed a decrease in the aversive response compared to CTL, given the no difference in remaining in the aversive arm compared to the safe one in the test phase, while CTL continued to avoid the aversive arm [CTL: $p=0.002$, $p=0.008$, $p=0.04$ (experiments 1, 2 and 3 respectively)]. We also saw that in experiment 1, oxytocin favored coping with aversive situations, given the longer time spent in the aversive arm during training compared to CTL ($p=0.04$), similar to what was seen in experiment 3 in the test phase ($p < 0.0001$). In motor activity, no changes were observed in the parameter. In the C-fos analysis, we found that in the CA3 and dentate gyrus regions of the hippocampus it was possible to verify the effect of oxytocin treatment on the increase in immunoreactivity ($p=0.03$ and $p=0.01$ respectively), in addition to the anterior cingulate cortex also with an increase ($p=0.04$) and central amygdala that showed a decrease in the parameter for OXY animals ($p=0.04$). For the CA1 region, basolateral amygdala, prelimbic and infralimbic cortex, there was no effect of treatment on immunoreactivity ($p=0.07$, $p=0.36$, $p=0.37$ and $p=0.07$ respectively). The present study highlights the effects of oxytocin administration in reducing aversive responses. The findings of the present work suggest that oxytocin can modulate the limbic system, providing a better understanding of how it functions in relation to aversive memories.

Keywords: Hypothalamic hormones; Fear; Stereotaxis; Behavioral response.

RESUMO PARA SOCIEDADE

Os estudos relacionados a formação de uma memória, facilitaram o entendimento de como as memórias são formadas e como estas podem ser modificadas visando o tratamento de distúrbios relacionados ao medo. Uma das formas de modificar as memórias é através do uso de medicamentos que alteram os mecanismos cerebrais envolvidos com o processo de formação de memórias. Entre os medicamentos, a ocitocina tem ganhado destaque por possibilitar mudanças de comportamento frente a estímulos aversivos. A ocitocina é uma substância que é produzida naturalmente pelo nosso corpo e tem funções importantes já conhecidas como ajudar na contração do útero durante o parto e na ejeção do leite da mãe durante a amamentação, mas estudos também tem mostrado o efeito da mesma sobre as memórias relacionadas ao medo. Dessa forma, acreditamos que a ocitocina tem potencial de ser uma forma a mais de ajudar no tratamento do medo por modificar a forma como as memórias de medo funcionam. Para testar essa ideia, utilizamos ratos de laboratório que foram divididos em 2 grupos, um que recebeu a injeção de ocitocina e outro que recebeu uma solução que continha água. Para vermos se a ocitocina causou alteração na memória dos animais, realizamos uma tarefa comportamental onde os mesmos eram assustados com som e luz sempre que entravam num local chamado aversivo durante uma etapa que chamamos de treino e no dia seguinte, na fase chamada teste, avaliamos se o animal lembra do susto pela evitação do local aversivo. Como resultado, vimos que os animais que receberam a injeção de ocitocina apresentaram menos comportamento de medo se comparados aos que receberam a solução com água. Quando injetamos a ocitocina, os animais diminuem a resposta de medo, passando mais tempo no local aversivo, nos indicando prejuízo na memória de medo além de apresentarem prejuízo no aprendizado da informação aversiva. Percebemos ainda que os animais que receberam a ocitocina diminuíram a preferência de local, visto que durante a tarefa exploraram os demais locais do aparato de maneira semelhante, além de possivelmente estarem mais motivados a explorar os diferentes locais do aparato, por conta de não lembrarem do local com o estímulo de medo. Verificamos ainda que as alterações comportamentais que vimos ocorrerem como consequência de modificações neuroquímicas que ocorrerem em regiões do cérebro envolvidas com a resposta ao medo. Concluimos com nosso estudo que a injeção de ocitocina no hipocampo causou diminuição da resposta dos animais ao medo, além de aumentar o enfrentamento de situações que podem causar medo, servindo como base para estudos futuros que pretendam investigar o efeito da substância para o tratamento do medo patológico.

ABSTRACT FOR SOCIETY

Studies related to the formation of a memory have facilitated the understanding of how memories are formed and how they can be modified with a view to treating fear-related disorders. One of the ways to modify memories is through the use of medications that alter the brain mechanisms involved in the memory formation process. Among medications, oxytocin has gained prominence for enabling behavioral changes when faced with aversive stimuli. Oxytocin is a substance that is produced naturally by our body and has important functions that are already known, such as helping to contract the uterus during childbirth and to eject the mother's milk during breastfeeding, but studies have also shown its effect on memories related to fear. Therefore, we believe that oxytocin has the potential to be another way of helping to treat fear by modifying the way fear memories work. To test this idea, we used laboratory rats that were divided into 2 groups, one that received the oxytocin injection and the other that received a solution containing water. To see if oxytocin caused changes in the animals' memory, we carried out a behavioral task where they were scared with sound and light whenever they entered a place called aversive during a stage we called training and the next day, in the phase called test, we evaluated whether the animal remembers the fright by avoiding the aversive location. As a general result, we saw that the animals that received the oxytocin injection showed less fearful behavior compared to those that received the water solution. When we inject oxytocin, the animals decrease their fear response, spending more time in the aversive location, indicating impairment in fear memory in addition to presenting impairment in learning aversive information. We also noticed that the animals that received oxytocin had reduced place preference, since during the task they explored other locations on the apparatus in a similar way, in addition to possibly being more motivated to explore different locations on the apparatus, due to not remembering the place with the fear stimulus. We also verified that the behavioral changes we saw occurred as a consequence of neurochemical changes that occurred in regions of the brain involved in the fear response. We conclude from our study that the injection of oxytocin into the hippocampus caused a decrease in the animals' response to fear, in addition to increasing their coping with situations that can cause fear, serving as a basis for future studies that intend to investigate the effect of the substance for the treatment of pathological fear.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das etapas da formação de memória.....	24
Figura 2 - Representação da estrutura molecular da ocitocina.....	32
Figura 3 - Efeito da ocitocina em diferentes grupos taxonômicos.....	34
Figura 4 - Representação esquemática das vias de comunicação entre córtex cingulado, córtex pré-frontal e amígdala.....	41
Figura 5 - Representação esquemática da comunicação entre as porções lateral e medial da amígdala central.....	42
Figura 6 - Representação esquemática da comunicação entre a massa celular intercalada e as porções basolateral e central da amígdala.....	44
Figura 7 - Representação esquemática da comunicação entre amígdala e massa celular intercalada durante a integração de informações sensoriais.....	45
Figura 8 - Representação esquemática do envolvimento do córtex infralímbico com o processo de extinção de memórias aversivas.....	47
Figura 9 - Representação esquemática da ação da ocitocina sobre núcleos envolvidos com a resposta ao medo.....	49
Figura 10 - Representação esquemática da comunicação entre hipocampo e neocórtex.....	52
Figura 11 - Tipos celulares encontrados nas fases do ciclo estral.....	58
Figura 12 - Imagens representativas das fases do ciclo estral.....	59
Figura 13 - Aparelho estereotáxico.....	60
Figura 14 - Imagem de um corte encefálico de rato retirado de Paxinos e Watson.....	61
Figura 15 - Representação esquemática dos pontos de perfuração no crânio das ratas.....	62
Figura 16 - Representação esquemática da alocação da cânula e mandril.....	63
Figura 17 - Imagens representativas dos pontos de alocação das cânulas no encéfalo do animal.....	64
Figura 18 - Representação esquemática da alocação de cânula e administração dos fármacos.....	65
Figura 19 - Delineamento do experimento 1.....	66
Figura 20 - Delineamento do experimento 2.....	67
Figura 21 - Delineamento do experimento 3.....	68
Figura 22 - Delineamento do experimento 4.....	68
Figura 23 - Labirinto em Cruz elevado modificado.....	69

Figura 24 - Representação esquemática do Labirinto em Cruz Modificado no treino e teste.....	70
Figura 25 - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) na comparação dos braços seguro e aversivo (Experimento 1).....	79
Figura 26 - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) no braço aversivo (Experimento 1).....	81
Figura 27 - Efeito da ocitocina sobre número de entradas no braço aversivo e nos braços abertos (Experimento 1).....	82
Figura 28 - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) nos braços abertos (Experimento 1).....	83
Figura 29 - Efeito da ocitocina sobre a análise de risco nos braços aversivo e abertos na tarefa de labirinto em cruz modificado (Experimento 1).....	85
Figura 30 - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) na comparação dos braços seguro e aversivo (Experimento 2).....	87
Figura 31 - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) no braço aversivo (Experimento 2).....	89
Figura 32 - Efeito da ocitocina sobre número de entradas no braço aversivo e nos braços abertos (Experimento 2).....	90
Figura 33 - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) nos braços abertos durante treino e teste na tarefa de labirinto em cruz modificado (Experimento 2).....	91
Figura 34 - Efeito da ocitocina sobre a análise de risco nos braços aversivo e abertos na tarefa de labirinto em cruz modificado (Experimento 2).....	93
Figura 35 - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) na comparação dos braços seguro e aversivo (Experimento 3).....	95
Figura 36 - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) no braço aversivo (Experimento 3).....	97
Figura 37 - Efeito da ocitocina sobre número de entradas no braço aversivo (A) e nos braços abertos (Experimento 3).....	98

Figura 38 - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) nos braços abertos (Experimento 3).....	99
Figura 39 - Efeito da ocitocina sobre a análise de risco nos braços aversivo e abertos na tarefa de labirinto em cruz modificado (Experimento 3).....	101
Figura 40 - Efeito da ocitocina sobre a imunorreatividade para C-Fos em :CA1, CA3, Giro denteado, córtex cingulado anterior, córtex pré-límbico, córtex infralímbico amígdala basolateral e amígdala central.....	102
Figura 41 - Imagens representativas da imunorreatividade para C-Fos.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do ciclo estral nos animais do experimento 1.....	75
Tabela 2 - Efeito da ocitocina sobre a distância total percorrida durante treino e teste na tarefa de labirinto em cruz modificado.....	77

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	MEMÓRIA	20
2.1.1	Etapas da formação de memória	22
2.1.2	Aquisição	24
2.1.3	Consolidação	25
2.1.4	Evocação	27
2.1.5	Memória aversiva	28
2.2	OCITOCINA	30
2.2.1	Mecanismo de ação e distribuição do receptor ocitocinérgico	35
2.2.2	Ocitocina e sua relação com memórias aversivas	39
2.2.3	Ocitocina hipocampal e modulação de memórias aversivas	49
3	OBJETIVOS	54
3.1	GERAL	54
3.2	ESPECÍFICOS	54
4	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1	ANIMAIS	55
4.2	DROGAS	55
4.3	PROCEDIMENTOS GERAIS	55
4.3.1	Monitoramento do ciclo estral	56
4.3.2	Cirurgia estereotáxica	58
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	64
4.4.1	Experimento I - Efeito da ocitocina sobre aquisição de memórias aversivas	65
4.4.2	Experimento II - Efeito da ocitocina sobre a consolidação de memórias aversivas	66
4.4.3	Experimento III - Efeito da ocitocina sobre a evocação de memórias aversivas	66
4.4.4	Experimento IV – Efeito da ocitocina sobre imunorreatividade para C-Fos. 67	
4.5	TESTE COMPORTAMENTAL	67
4.5.1	Parâmetros avaliados	69
4.6	PERFUSÃO DOS ANIMAIS E PREPARAÇÃO DOS ENCÉFALOS	70
4.7	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA C-FOS	71

4.8	AQUISIÇÃO DE IMAGENS E CONTAGEM DE CÉLULAS.....	72
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	72
5	RESULTADOS.....	74
5.1	ATIVIDADE MOTORA.....	75
5.2	EXPERIMENTO 1 – EFEITO DA OCITOCINA NA AQUISIÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS.....	76
5.3	EXPERIMENTO 2 – EFEITO DA OCITOCINA NA CONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS.....	84
5.4	EXPERIMENTO 3 – EFEITO DA OCITOCINA NA EVOCAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS.....	92
5.5	EXPERIMENTO 4 – EFEITO DA OCITOCINA SOBRE IMUNORREATIVIDADE PARA C-Fos.....	100
6	DISCUSSÃO.....	104
7	CONCLUSÃO.....	119
	REFERÊNCIAS.....	121
	APÊNDICES.....	130
	ANEXOS.....	132
	CARTA DE ACEITE DO PROJETO.....	132

1 INTRODUÇÃO

O estudo da neurobiologia da memória possibilitou entender como aspectos relacionados a emoções podem levar a mudanças no comportamento de um indivíduo. A memória pode ser descrita como a habilidade de adquirir uma informação proveniente do meio, armazená-la e posteriormente acessá-la, tornando o conhecimento adquirido de grande importância em situações cotidianas como tomada de decisão e mudança de comportamentos (BERGSTROM, 2016; JOSSELYN; FRANKLAND, 2018).

Para que a memória seja formada é necessário que haja a aprendizagem através de associações dos fatores envolvidos com a informação a ser adquirida. Esse processo é a forma como novas memórias são formadas visto que a nova informação que está sendo obtida, interage com um aprendizado anterior já armazenado, formando um conhecimento novo e para a obtenção dessa informação recorre-se a habilidades sensoriomotoras que ao fim do processo produz uma memória que leva a um padrão de comportamento (ARAKAWA, 2019; BLAISDELL, 2019; HERSZAGE; CENSOR, 2018).

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na formação da memória, possibilitou o avanço nos estudos acerca das memórias aversivas. Esse tipo de memória está relacionado à vivência de eventos traumáticos, que podem ser armazenados de maneira imediata e persistir ao longo do tempo. A memória aversiva acarretou numa vantagem evolutiva que possibilitou prever e evitar ameaças, diminuindo o risco dos indivíduos serem prejudicados. Entretanto, existem indivíduos em que a resposta ao medo é mais expressa, ocasionando facilitação na evocação da memória aversiva, tornando a resposta patológica. Para esses indivíduos, abordagens terapêuticas são desenvolvidas e aplicadas visando diminuir a resposta frente às situações que causem medo (BERGSTROM, 2016; CHU *et al.*, 2019; GERLICHER; TÜSCHER; KALISCH, 2019; KONDRAKIEWICZ *et al.*, 2019; PITTIG, 2019).

Nesse sentido, uma das abordagens utilizadas é o uso de fármacos como os benzodiazepínicos, que através da modulação de receptores gabaérgicos podem ocasionar efeitos amnésicos (SILVA; FRUSSA-FILHO, 2000). Entretanto, novas vias

e substâncias envolvidas com o medo vêm sendo estudadas e nesse sentido muito têm se discutido sobre a ocitocina e sua relação com os mecanismos envolvidos com a formação de memórias aversivas.

A ocitocina é um neuropeptídeo produzido no hipotálamo, que desempenha funções clássicas como ejeção do leite materno durante a amamentação e promoção da contração uterina durante o parto. Entretanto, já há relatos do envolvimento da ocitocina com aprendizagem, formação de memórias, medo, estresse, ansiedade e depressão. O hormônio pode promover plasticidade sináptica no hipocampo, além de agir sobre a amígdala e regiões corticais, sendo estas envolvidas também com a formação de memórias. A ocitocina pode ainda promover aumento de conexões excitatórias no hipocampo desinibindo-o, mas alternativamente pode também levar a um aumento da transmissão inibitória deste (BELL; ERICKSON; CARTER, 2014; DUMAIS; VEENEMA, 2016; LIN; HSU, 2018; HAN *et al.*, 2019; ÇALIŞKAN; ŞAHİN; GÜLDAĞ, 2021; LI *et al.*, 2021).

A ocitocina pode auxiliar no tratamento do medo patológico, devido a sua capacidade de alterar os mecanismos envolvidos com a formação da memória. Em complemento, a modulação ocasionada pela ocitocina na circuitaria envolvida com o medo ocorre de maneira similar tanto em humanos quanto em roedores (KEUM; SHIN, 2019). Nas regiões cerebrais envolvidas com a resposta ao medo, como córtex cingulado anterior e amígdala, quando bloqueadas, podem ocasionar diminuição da aprendizagem, levando os indivíduos ou animais à uma maior exposição às situações de ameaça (KOHLHOFF *et al.*, 2022; WAHIS *et al.*, 2021; YAMAGISHI; LEE; SATO, 2020).

Diante disso, o presente estudo objetivou verificar o efeito da ocitocina administrada no hipocampo em diferentes fases da formação de memórias aversivas, além da verificação da imunorreatividade para C-Fos tanto no hipocampo quanto na amígdala e córtices cingulado, pré-límbico e infralímbico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MEMÓRIA

A memória é a capacidade de acessar informações previamente adquiridas. Também pode ser definida como o fenômeno de reter informações através de experiências vivenciadas, juntamente com a capacidade de reconstruir (ou lembrar) esses dados quando necessário (JOSSELYN; FRANKLAND, 2018).

As memórias são de fundamental importância na orientação sobre tomadas de decisão, no desenvolvimento de emoções, além de moldar o comportamento, com base em experiências (BERGSTROM, 2016). Dessa forma, o estudo da memórias tem sido uma área multidisciplinar da construção do conhecimento (SCHACTER, 2019).

Existem diferentes tipos de memórias, como episódica, verbal, visual, olfativa, entre outras (BABAEI; MIRZABABAEI; NASSIRI-ASL, 2018). Entretanto, para facilitar o entendimento a respeito dos variados tipos de memórias, elas podem ser classificadas de acordo com: a sua função, seu conteúdo, e o tempo que duram (IZQUIERDO, 2011).

Quanto ao conteúdo, um tipo de memória dessa categoria é a explícita. Esta é associada a recordação ativa e consciente de fatos (HINE; TSUSHIMA, 2018). As memórias explícitas, são responsáveis por reter informações sobre fatos, pessoas, lugares e coisas, além de incluir memórias episódicas (ALBERINI *et al.*, 2018). Já esta memória se refere a uma memória que contém informações específicas sobre tempo e lugar (MOSCOVITCH *et al.*, 2016). Este tipo de memória é responsável por unificar estímulos de tempo e espaço formulando assim uma representação do acontecido (episódio) que faça sentido (VOSS *et al.*, 2017). Além desses fatores, a memória episódica também é relacionada à experiência emocional que acompanha as informações espaciais e temporais, associando assim essas duas dimensões (SEKERES; WINOCUR; MOSCOVITCH, 2018). Esses eventos são provisoriamente organizados no hipocampo, que facilita o armazenamento das informações posteriormente em regiões corticais (EICHENBAUM, 2017b).

As memórias implícitas, são o segundo tipo na classificação quanto ao conteúdo da informação armazenada. Esta refere-se às memórias que podem ser aprendidas e recuperadas de maneira não consciente (YANG; MERRILL, 2018). Este tipo pode ser verificado através da repetição, identificação e generalização de estímulos previamente codificados (SPATARO *et al.*, 2016).

As informações previamente adquiridas são acessadas de maneira inconsciente e/ou automática, ou seja, sem que seja necessário recordar conscientemente da informação, bastando apenas que um fragmento de informação seja apresentada para que toda a memória seja recuperada (SCHACTER, 2019). A memória implícita é o tipo de memória que é avaliada em estudos com animais, devido à dificuldade em traçar uma clara distinção entre memórias explícitas e implícitas em espécies não-humanas. Além disso, como na memória explícita declarativa existe o relato do fato ocorrido, torna-se mais difícil de afirmar que animais possuem esse tipo de memória visto que os mesmos não relatam a experiência vivenciada e dessa forma, não se pode afirmar que os animais apresentam um recordar ativo (HAMPTON; ENGELBERG; BRADY, 2020).

Outra classificação da memória é relacionada a quanto ao tempo de duração dessas memórias. Esse tipo é subclassificado de maneira simplificada em memória de curta duração, longa duração e remota (IZQUIERDO, 2011).

A memória de curto prazo, também chamada de memória de curta duração é aquela que perdura de segundos a horas e distingue das de longo prazo e remota (além do tempo de duração), por conta dos mecanismos e circuitaria biológica envolvidos com sua formação e a armazenamento (ALBERINI *et al.*, 2018). Esse tipo de memória apresenta capacidade de armazenamento limitada, contudo essa limitação serviu como vantagem evolutiva, visto que, excluindo fatores que possam confundir é possível manter o foco em informações que são essenciais (CASCELLA; AL KHALILI, 2022).

As memórias de longa duração são um tipo mais estável de memória se comparadas às de curto prazo, tem capacidade de durar de horas a dias e tem potencial para durar por toda a vida. Além disso, este tipo de memória foi de grande importância para adaptar o comportamento dos indivíduos frente as alterações ambientais já vivenciadas pelo mesmo (ALBERINI *et al.*, 2018; KIDA, 2019). Um fato

interessante desse tipo é que esta é formada pela transformação de uma memória de curto numa de longo prazo por conta de processos plásticos que ocorrem no cérebro (ZHANG *et al.*, 2018). Diferente da memória de curto prazo, a de longo apresenta grande capacidade para armazenamento de informações, para tanto é necessário mais tempo para que a informação seja armazenada de maneira eficiente (ASOK *et al.*, 2019).

O último tipo de memória classificada pelo tempo de duração é a memória remota. Também podendo ser chamada de memória longuíssimo prazo, é um tipo de memória que persiste por décadas, podendo ser evocada durante toda a vida do indivíduo. Neste tipo de memória temos a memória de eventos traumáticos, também chamada memória de medo, que pode ser formada de maneira instantânea e permanecer intacta durante a vida toda (BERGSTROM, 2016).

2.1.1 Etapas da formação de memória

Para que as memórias desempenhem suas funções de maneira adequada a determinada tarefa, é necessário que primeiro haja sua formação de maneira eficiente. Esse processo de formação é comumente dividido em fases, sendo elas: aquisição, consolidação e evocação (Figura 1) (SAMUEL *et al.* 2018), sendo esses processos intimamente relacionados a processos de adição, eliminação e remodelação de sinapses (LIESTER, 2020). Além disso, para que a memória seja formada é necessário que ocorra também a modificação de uma representação interna de alguma experiência, seja por aquisição de novas informações ou por atualização de informações já armazenadas. Essas modificações geram, possivelmente, um novo padrão e/ou comportamento, e a esse processo dá-se o nome de aprendizagem (FERNÁNDEZ *et al.*, 2016).

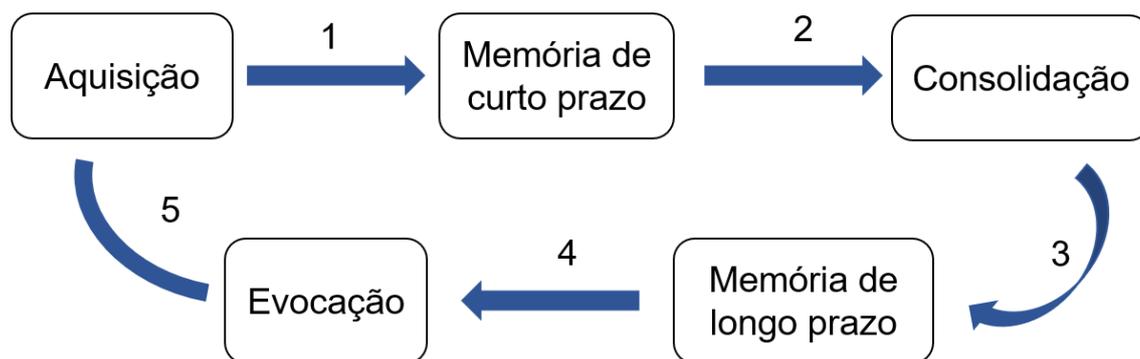


Figura 1 - Representação esquemática das etapas da formação de memória. Fonte: Adaptado de Noyes; Phan; Davis (2021)

A aprendizagem permitiu que padrões comportamentais dos animais fossem modificados baseados em experiências passadas, permitindo o aperfeiçoamento de capacidades vocais e motoras ou ainda funções que possibilitem a sobrevivência como uma maneira de obter alimento e evitar o perigo. (OZAWA; JOHANSEN, 2018). Além disso, permitiu aos animais aprenderem sobre o mundo através de associações e situações de causalidade, levando ao desenvolvimento de habilidades como a predição, baseadas na detecção de eventos atuais semelhantes a outros já ocorridos (BLAISDELL, 2019).

O processo de aprendizagem é a maneira pela qual novas informações são adquiridas para a formação de novas memórias. Uma vez que essas novas informações são internalizadas numa memória, existe uma interação entre a nova informação e um conhecimento pré-existente. Esse processo pode resultar na modificação dessa memória anterior, ocasionando a formação de uma nova memória independente ou ainda na integração das duas informações formando uma única memória (HERSZAGE; CENSOR, 2018). Em complemento, a obtenção dessas informações ocorre em consequência majoritariamente de habilidades sensoriomotoras que ao formar uma memória, produz um padrão comportamental (ARAKAWA, 2019).

Uma vez que o processo de aprendizagem esteja funcionando de maneira correta, a formação da memória pode ser didaticamente dividida em 4 etapas, sendo elas: aquisição, que pode ser chamada também de codificação; consolidação da informação; evocação, sendo a recuperação dessa informação armazenada e também o esquecimento (NOYES; PHAN; DAVIS, 2021). Áreas como hipocampo,

córtex e amígdala são exemplos de regiões encefálicas envolvidas com os processos de aprendizagem e memória (HAN *et al.*, 2019). Nessas regiões, durante o processo de formação ocorrem modificações sinápticas que são importantes nas fases de captar e armazenar a informação obtida do ambiente (SHEPPARD *et al.*, 2018).

2.1.2 Aquisição

A aquisição pode ser definida como o processamento das informações que estão sendo recebidas, sendo essa etapa o primeiro passo necessário para a formação de memórias. Apesar de poder ocorrer de maneira inconsciente e automaticamente, os processos de percepção e atenção são partes integrais da codificação da informação na memória (HINE; TSUSHIMA, 2018). Durante a aquisição, diferentes elementos do ambiente são obtidos para essa etapa inicial da formação da memória, como informações visuais, sonoras, olfativas, táteis, etc. Essas informações são obtidas e unidas para formar uma memória baseada no determinado contexto no qual essas informações foram captadas (CASCELLA; AL KHALILI, 2022).

Uma vez que a nova informação está sendo adquirida, grupos de neurônios são recrutados, por conta de conexões sinápticas já existentes entre eles, em resposta ao processo de aprendizagem, para realizarem o processamento da informação que está sendo captada. Em geral esses neurônios são pertencentes a diversas áreas encefálicas que se encontram interconectadas (HOLTMAAT; CARONI, 2016), formando uma grande rede neural que é recrutada durante todo o processo (DE QUERVAIN; SCHWABE; ROOZENDAAL, 2016). Durante essa fase, há intensa atividade no hipocampo e para isso há um aproveitamento de redes neurais previamente existentes, formando um elo entre a nova informação e memórias previamente estabelecidas, gerando uma nova memória de curta duração (VOSS *et al.*, 2017). Para que esse processo ocorra, há na região a ativação de vias excitatórias glutamatérgicas em neurônios pré-sinápticos e pós-sinápticos que conseqüentemente levam a maior resposta destes por maior ativação dos receptores de glutamato das sinapses já existentes e estabilizadas (ASOK *et al.*, 2019).

Uma vez que a informação é adquirida e a memória é formada, quando há recuperação da informação (lembrar), esse grupo de células que funcionam como

circuitos são ativados e reativados e a esse grupo de células ‘detentoras’ de memórias dá-se o nome de engrama (ROY *et al.*, 2017). Especificamente, o engrama é nome dado aos circuitos neurais interconectados no qual as memórias são armazenadas no encéfalo. Dessa forma, as ligações mantidas entre esses grupos de células permitem a recuperação da memória (HOLTMAAT; CARONI, 2016).

A característica do processo de aquisição de memória usando apenas estruturas pré-existentes, além do desgaste gerado pela alta excitabilidade dessa rede, limita o tempo e quantidade de informação que pode ser adquirida e armazenada nesse primeiro momento. Em complemento, nesse tipo de memória a informação é temporariamente armazenada enquanto a rede envolvida com essa informação estiver ativa (DEMOULIN; KOLINSKY, 2016). Dessa maneira entende-se que o hipocampo tem papel crítico, mas capacidade limitada na fase inicial de aquisição (MENON, 2016).

2.1.3 Consolidação

Uma vez que o processo de aquisição seja repetido, e a ativação do mesmo engrama para uma determinada informação seja sustentada, um processo plástico é induzido. Esse processo consiste em converter essa memória de curto prazo, limitada e mais suscetível a perda, numa de longo prazo que é mais estabilizada e a ele é dado o nome de consolidação (KIDA, 2019). Para tanto, o processo de armazenamento se torna mais lento, visto que durante esta fase uma série de alterações celulares são necessárias para reorganizar um circuito já estabelecido e a nova memória que está sendo estabilizada (BERGSTROM, 2016).

Uma dessas alterações é o aumento na plasticidade sináptica, fortalecendo as conexões neuronais já existentes, envolvidas com a memória em questão e/ou a criação de novas conexões que sirvam como base para a memória que está sendo armazenada. Além disso, é necessário ainda o aumento na transcrição gênica, para a produção de novas proteínas que vão servir como substrato para todo o processo de modificação sináptica tanto em neurônios pré quanto pós sinápticos (ASOK *et al.*, 2019). A esse alto nível de plasticidade sináptica e intensa atividade neuronal, devido ao processo de formação de memórias, dá-se o nome de potencial de longa duração,

esse processo juntamente com regiões que dão suporte ao hipocampo podem alterar a forma como a informação é armazenada e conseqüentemente alterar um comportamento de resposta frente a determinado estímulo que venha a ativar essa memória (KUTLU; GOULD, 2016). Durante essa fase há intensa atividade glutamatérgica que leva ao fortalecimento de uma determinada rede que está sendo recrutada para o armazenamento mais estável da informação obtida, enquanto que simultaneamente são ativos fatores gênicos que darão suporte ao processo (KLATT, 2018).

Apesar de didaticamente as etapas de aquisição e consolidação de memória sejam separadas, os processos ocorrem simultaneamente. Dessa forma é difícil afirmar onde uma etapa termina e a outra começa. A citar, o potencial de longa duração, apesar de fortemente associada à fase de consolidação, pode ser dividido em fases. Uma fase mais precoce, onde ocorre uma potencial de longa duração inicial, na qual não há alterações na transcrição gênica, mudanças morfológicas ou produção de novas proteínas, (semelhante ao observado na etapa de aquisição da informação). A outra fase da potencial de longa duração é a tardia, que exige tanto a ativação da rede preexistente quanto dos processos plásticos citados (SHEPPARD *et al.*, 2018).

Além disso, há também o aumento de projeções hipocampais para outras regiões do cérebro envolvidas com o armazenamento de memórias estabilizadas (DE QUERVAIN; SCHWABE; ROOZENDAAL, 2016). Das regiões ligadas ao hipocampo que recebem suas projeções durante a formação da memória, pode-se destacar as regiões neocorticais. Uma vez que um novo engrama seja formado e estabelecido e a consolidação é completada, o hipocampo passa a atuar menos sobre essa memória e ser menos estimulado quando a evocação é requerida, passando para a região cortical o papel de armazenar e fornecer a informação armazenada quando for requerida posteriormente. Nesse sentido, esta região passa a ser mais ativa enquanto que o hipocampo fica responsável por reconhecer apenas um fragmento da informação que pode levar ao acesso à informação completa (DENARDO *et al.*, 2019). Uma vez que a estabilidade tenha sido alcançada, um processo inverso a potencial de longa duração é iniciado, sendo o processo chamado depressão de longa duração.

Em síntese, a depressão de longa duração é um processo que leva ativamente a diminuição da eficácia sináptica e para isso, inicialmente regula a liberação pré-sináptica do glutamato, diminuindo a probabilidade do neurotransmissor ser

empacotado em vesículas. Essa modulação é reforçada por outra que ocorre no neurônio pós-sináptico, visto que este realiza uma transmissão retrógrada de óxido nítrico que ocasiona aumento de GMP cíclico, esse aumento regula negativamente o cálcio intracelular, diminuindo o processo de exocitose que culmina na diminuição da liberação do glutamato, além de estimular canais de potássio. Outra mudança pode ser ainda a modulação da resposta do receptor glutamatérgico pós-sináptico, que está intimamente ligado com alterações na sinalização intracelular de cálcio, uma vez que a diminuição do cálcio leva a diminuição da resposta do receptor glutamatérgico. Além disso há ainda, assim como na potencial de longa duração, a síntese de proteínas que auxiliam na regulação, favorecendo a depressão de longa duração (CONNOR; WANG, 2016).

Devido a diversidade de alterações plásticas que ocorrem durante a fase de consolidação, esta etapa tem sido alvo de inúmeros estudos tanto em humanos quanto em animais, visando melhor compreender esse sistema e tentar modular o mesmo, na busca de tratamentos relacionados ao medo e memórias aversivas.

2.1.4 Evocação

A terceira etapa da formação de uma memória envolve um processo chamado evocação. Também podendo ser chamada de recuperação da memória, esta fase consiste na reativação de uma circuitaria neural pré-estabelecida a partir de pistas internas ou externas, que levem ao acesso de informações previamente armazenadas num engrama. Essa recuperação envolve ativação de diversos mecanismos via estimulação glutamatérgica, mas também colinérgico, gabaérgico, serotoninérgico entre outros (BOSTANCIKLIOĞLU, 2020). Para esse processo acontecer corretamente é necessário a disponibilidade funcional do engrama e a pista que contém um fragmento de informação, que leva a ativação do circuito por completo (MACDONALD; COTE, 2021).

Essa recuperação da informação armazenada pode ser acessada com o auxílio de diferentes regiões do encéfalo a depender do tipo de memória (DE QUERVAIN; SCHWABE; ROOZENDAAL, 2016). A título de ilustração, temos a recuperação de uma memória episódica, na qual o córtex entorrinal realiza uma ponte entre o

hipocampo e regiões neocorticais (LEWIS, 2017). Entre essas regiões pode-se destacar o córtex pré-frontal, envolvido com a tomada de decisão, além do equilíbrio e planejamento de comportamentos. O córtex pré-frontal apresenta alto nível de interação com o hipocampo e por esse motivo auxilia fortemente no processo de formação e evocação de memórias, através do controle cognitivo desenvolvido pela região (MENON, 2016).

Mais especificamente, enquanto o hipocampo organiza a memória a depender do contexto, o córtex pré-frontal é responsável por realizar a recuperação da memória apropriada a determinado contexto, suprimindo memórias concorrentes e inapropriadas a situação experienciada (EICHENBAUM, 2017a). O córtex pode ainda realizar a integração de pistas específicas reconhecidas conscientemente com informações genéricas reconhecidas de maneira não consciente que fazem parte de outro engrama, levando a um maior detalhamento da situação que está sendo vivenciada (BEKINSCHTEIN; WEISSTAUB, 2014).

A evocação por vezes é relatada como o ponto final do processo de formação de memórias, visto que de maneira geral é tratada como uma fase que apenas vai captar uma memória armazenada e trazê-la para a consciência. Entretanto a evocação também pode ser tratada como ponto de início, uma vez que quando essa memória é recuperada, novas ações, decisões e emoções podem fortalecer o engrama estabelecido ou ocasionar uma reorganização do engrama, gerando uma atualização da memória (KENSINGER; FORD, 2020).

2.1.5 Memória aversiva

As memórias aversivas, ou memórias do medo, são um tipo de memória relacionada a eventos traumáticos, que podem ser formadas de maneira imediata e que apresentam grande capacidade de resistir armazenada ao longo do tempo (BERGSTROM, 2016). Uma via clássica no estudo de memória de medo é o medo condicionado, que foi estudado inicialmente por Pavlov (REYNOLDS; ASKEW, 2018). O medo condicionado é relatado como um processo de aprendizagem associativa que foi conservado ao longo do processo evolutivo e possibilitou o desenvolvimento de respostas defensivas frente a um estímulo dito neutro, mas que prediz alguma

ameaça (CHU *et al.*, 2019). Dessa forma, a resposta gerada por esse estímulo neutro permitiu que os indivíduos adquirissem informações a respeito de uma possível ameaça, sem necessariamente correr um risco para obter essa resposta defensiva (KONDRAKIEWICZ *et al.*, 2019).

No medo condicionado, as fases necessárias para a formação de uma memória estão incluídas, desde a aquisição até a evocação. Nos estudos de Pavlov, durante a aquisição da informação era ofertado um estímulo condicionado (como um som), juntamente com um estímulo aversivo incondicionado (um choque), gerando uma resposta condicionada, que em geral é uma resposta defensiva. Uma vez que esse processo tenha sido devidamente aprendido, a presença do som (estímulo condicionado) é capaz de gerar resposta condicionada, sem que haja a presença do estímulo incondicionado (HAAKER *et al.*, 2019). Essas situações estressoras tem potencial de induzir alterações no encéfalo, no qual a manutenção dessas situações em altos níveis podem gerar prejuízos relacionados à ansiedade e/ou depressão (DU *et al.*, 2019).

De maneira geral, com a repetição do estímulo condicionado na ausência do estímulo incondicionado pode haver uma reconsolidação da memória aversiva, no qual o indivíduo associa uma nova informação (ausência desse estímulo aversivo) a que estava armazenada e foi evocada (o choque após o som), com isso esse novo contexto é armazenado como uma atualização da memória anterior (que havia a presença do estímulo aversivo). Em complemento, a resposta comportamental produzida visa a segurança do indivíduo. Entretanto, a produção desse comportamento de busca por segurança na ausência do agente aversivo, pode reforçar a memória aversiva, impedindo que o indivíduo aprenda e reforce uma nova memória onde não há o agente estressor. Dessa forma ocorre um loop entre lembrar de uma situação aversiva, realizar um comportamento de segurança, sem entender conscientemente o que está ocorrendo, que leva ao reforço dessa memória e consequentemente facilitando uma nova evocação posteriormente (PITTIG, 2019).

É nesse tipo de abordagem que algumas terapias como terapia cognitiva comportamental se apoiam para o tratamento de transtornos mentais como transtorno do estresse pós-traumático, transtorno de ansiedade generalizada, entre outras (SIMON *et al.*, 2020). As terapias baseadas em expor os pacientes a situações possivelmente estressoras, tem sido as mais utilizadas para o tratamento dessas

desordens, visando diminuir cada vez mais a resposta aversiva frente ao estímulo neutro associado a uma memória estressora (GERLICHER; TÜSCHER; KALISCH, 2019).

Entre os possíveis sistemas envolvidos com a formação de memórias, alterações hormonais vem se destacando por conta de seu possível envolvimento com os processos relacionados ao medo e/ou ansiedade. Hormônios relacionados ao estresse como norepinefrina e glicocorticóides (a citar cortisol) tendem a influenciar respostas fisiológicas relacionadas à aprendizagem, memória, medo e ansiedade, principalmente por exercerem modulação na atividade dos núcleos da amígdala e do hipocampo. Esses hormônios podem promover um potencial de longa duração, no caso da norepinefrina, que facilita a codificação da informação aversiva, ou alternativamente reduzir essa codificação no caso de glicocorticóides (MERZ; WOLF, 2022). Outro grupo de hormônios que possivelmente são capazes de modular a resposta frente ao estímulo aversivo são os hormônios sexuais. É crescente o número de estudos que verificam diferenças sexuais nos processos relacionados à aprendizagem e memória (RIBEIRO et al., 2010). Além disso, indivíduos do sexo feminino tem cerca de duas vezes mais chances de desenvolver transtornos relacionados ao medo e ansiedade se comparados ao do sexo masculino (VOULO; PARSONS, 2019). Por esse motivo acredita-se que o estradiol pode ser o responsável por esse dimorfismo por conta de estudos na literatura mostrarem efeitos desse hormônio sobre a neurogênese e potencial de longa duração. Entretanto ainda são necessários mais estudos para melhor compreender os mecanismos envolvidos com esse fenômeno (MAENG et al., 2017). Finalmente, outro hormônio que vem ganhando destaque é a ocitocina, devido a sua possível atuação em processos relacionados a memórias aversivas.

2.2 OCITOCINA

A ocitocina é um neuropeptídeo produzido no sistema nervoso central, formado por nove aminoácidos e é associado a produção de diversos comportamentos em mamíferos (YAMASUE; DOMES, 2018). A molécula foi descoberta em 1906 por Henry Dale e recebeu o nome oxitocina (Figura 2) vindo do grego, que significa 'nascimento rápido' devido ao seu efeito em induzir contrações uterinas. Adiante em 1953 se tornou

o primeiro hormônio polipeptídico a ser sequenciado e sintetizado (MAEJIMA *et al.*, 2018). Esse peptídeo é produzido principalmente pelos núcleos paraventricular e supraóptico, localizados numa região do encéfalo chamada hipotálamo (FELDMAN, 2017).

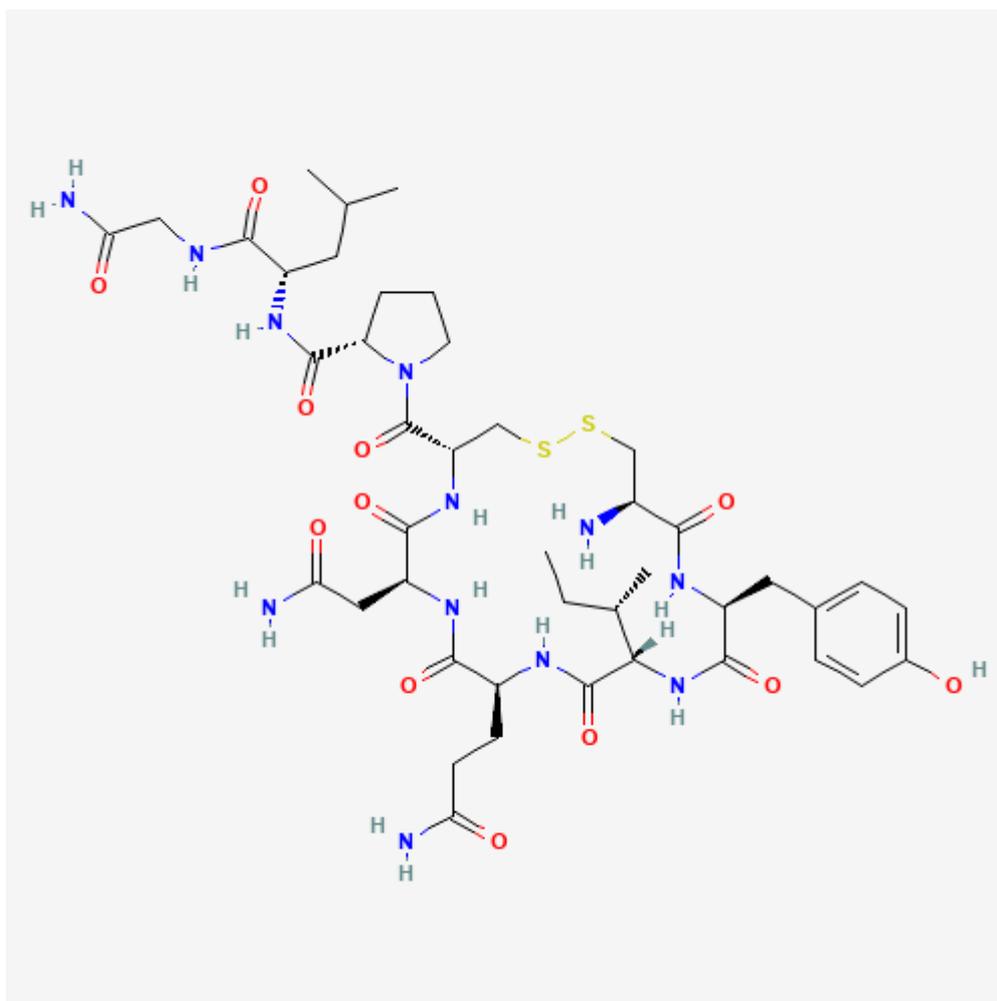


Figura 2 – Estrutura molecular da ocitocina, retirado de: National Center for Biotechnology Information (2024). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxytocin>.

Mais especificamente, o peptídeo é sintetizado por neurônios chamados magnocelulares, localizados nas regiões citadas (JONES *et al.*, 2017). Dentre as funções da ocitocina, são descritas as clássicas, envolvendo a ejeção do leite materno durante a amamentação, contrações uterinas durante o parto, ejaculação entre outras (DUMAIS; VEENEMA, 2016). Apesar destes efeitos serem mais discutidos em humanos e roedores, o hormônio apresenta funções em outros grupos taxonômicos (Figura 3), como os artrópodes, moluscos anelídeos e nematóides, além de outros

grupos de cordados (além dos humanos e roedores) como peixes, anfíbios, répteis e aves, tendo em cada grupo, comportamentos associados ao efeito da ocitocina (FELDMAN et al., 2016). Além disso, Vaidyanathan; Hammock, (2017) investiga em seu trabalho como a ocitocina pode atuar de maneira espécie-específica quanto a organização social. Os autores relatam ainda que espécies de roedores monogâmicos apresentam maior densidade de receptores ocitocinérgicos no núcleo accumbens se comparados a espécies poligâmicas, e que essa diferença pode estar envolvida com questões sociais relacionadas a comportamentos de preferência de parceiros. Em complemento, Caldwell, (2017) efeitos diferentes da ocitocina sobre comportamentos sociais como, agressão, cooperação, competição, afiliação e memória e sobre diferenças sexuais entre diferentes espécies de roedores e primatas humanos e não-humanos.

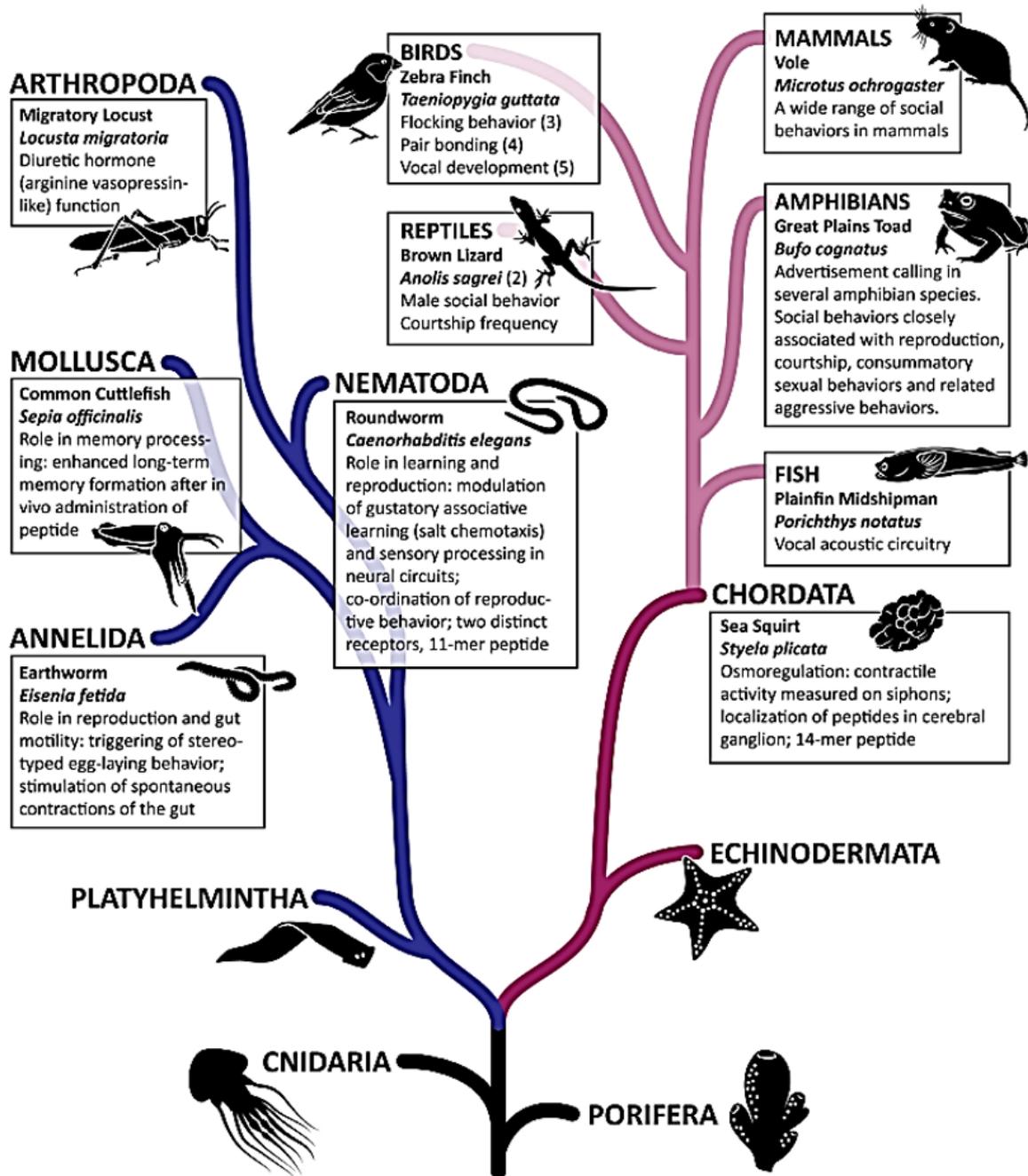


Figura 3. Efeito da ocitocina em diferentes grupos taxonômicos (retirado de (Feldman et al., 2016))

Entretanto, com o passar dos anos novos efeitos relacionados a ocitocina começaram a ser descritos e novas vertentes de pesquisa foram desenvolvidas, como o envolvimento da mesma com aspectos sociais como formação de pares e reconhecimento dos parceiros sexuais nas espécies, reconhecimento social relacionada à habilidade de recordar de um indivíduo da própria espécie e recordar da hierarquia existente, além de comportamentos agressivos como a competição por

hierarquia em comunidades visando uma maior estabilidade da mesma (CALDWELL, 2017),

Dessa forma, pode-se perceber o envolvimento da ocitocina em comportamentos adaptativos e emocionais (CARTER, 2017). Entre esses comportamentos não sociais, muito tem sido discutido sobre efeitos da ocitocina a aspectos envolvidos com a aprendizagem, formação de memórias, medo, estresse, ansiedade e depressão (LIN; HSU, 2018). Nesse sentido, é necessário melhor compreensão da distribuição dos receptores de ocitocina, visando entender como o hormônio age sobre o tecido neuronal das diferentes regiões que contêm estes receptores, e inferir como a estimulação destes podem modificar comportamentos e/ou emoções.

Além disso, a ocitocina pode apresentar ainda um dimorfismo sexual, no que diz respeito a ação do hormônio e localização de seus receptores podendo alterar funções cerebrais de maneira específica, na presença ou ausência do receptor ou seu ligante (VAIDYANATHAN; HAMMOCK, 2017). No córtex orbitofrontal a exemplo, a ocitocina parece ser mais importante no processamento emocional em mulheres que em homens (SUE CARTER *et al.*, 2020). Além disso, a variação hormonal durante os ciclos reprodutivos e as variações causadas por conta do uso de hormônios como métodos contraceptivos podem afetar a maneira como ocorrem a aprendizagem e extinção de memórias aversivas tanto em humanos quanto em roedores (HAAKER *et al.*, 2019).

Em complemento, variações nos níveis de estradiol em fêmeas têm sido relatados como possíveis moduladores de memórias aversivas, podendo aumentar respostas de medo e causar prejuízos na extinção de memórias (RIGGENBACH *et al.*, 2019). Além disso, estudos relatam ainda dimorfismo sexual na expressão de receptores ocitocinérgicos, em áreas importantes para a formação e recuperação de memórias como córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala e hipotálamo (JUREK; NEUMANN, 2018), com maior concentração de ocitocina hipotalâmica em animais do sexo feminino (DUMAIS; VEENEMA, 2016).

Contudo, apesar dessa dependência sexual existir tanto a nível celular quanto comportamental, a maior parte é realizada em animais do sexo masculino, sendo a principal causa dessa escolha a variação do ciclo reprodutivo no sexo oposto que pode alterar os resultados obtidos (KENDRICK; GUASTELLA; BECKER, 2018). Em

alguns estudos, há uma mescla no uso de animais machos e fêmeas, sem que haja verificação do efeito do ciclo menstrual, nem as diferenças entre os sexos, sendo ambos tratados como uma única amostra (ASHER; ASNAANI; ADERKA, 2017). Nesse sentido, percebe-se a necessidade da separação, entre sexo e ciclo estral, afim de descobrir os reais efeitos do sistema ocitocinérgico e as particularidades do mesmo sobre o parâmetro avaliado e sobre a região de interesse do estudo, levando a achados mais robustos que corroborem ou não a estudos anteriores.

2.2.1 Mecanismo de ação e distribuição do receptor ocitocinérgico

A ocitocina apresenta efeitos rápidos tanto no sistema nervoso central quanto fora dele, uma vez ligada ao seu receptor. Além disso, o sistema ocitocinérgico apresenta grande capacidade plástica, sendo capaz de ser alterado ao longo da vida e em complemento, às funções desempenhadas pelo hormônio podem ainda ser alteradas por experiências estressantes e traumáticas e/ou desafios físicos ou psicológicos (SUE CARTER *et al.*, 2020).

O receptor de ocitocina é um receptor de membrana que se liga especificamente e com alta afinidade à ocitocina e desenvolve seus efeitos (LIN; HSU, 2018). Esse receptor pertence a um grupo chamado receptores acoplados à proteína G, sendo esses receptores envolvidos com uma cascata de eventos através da ativação de segundo mensageiros (AL-SUHAIMI *et al.*, 2021). Esses receptores podem estar ligados a diferentes subunidades, sendo elas Gq, Gi ou Gs, sendo Gq descrito na maior parte dos estudos.

Nesse subtipo, uma vez unido o ligante, o receptor ativa uma cascata de segundo mensageiro que inicia com a ativação da fosfolipase C, esta hidrolisa o fosfatidil Inositol bifosfato em Inositol trifosfato (que age os estoques de cálcio causando liberação do mesmo) e diacilglicerol (que leva a ativação da proteína quinase C) (ARROWSMITH; WRAY, 2014; FELDMAN *et al.*, 2016).

Esta pode levar a ativação da via MAPK, que é amplamente estudada em tecidos neuronais e não-neuronais, que pode ocasionar a produção de prostaglandinas, contração do miométrio (JUREK; NEUMANN, 2018), processo esse reforçado pela atuação conjunta da interação do cálcio, liberado junto com o

calmodulina e pode paralelamente culminar na ativação de ERK que culmina na ativação de fatores de transcrição, que podem levar a produção de um potencial de longa duração, que conseqüentemente causa mudanças comportamentais ou alteram a atividade de canais iônicos (ÇALIŞKAN; ŞAHİN; GÜLDAĞ, 2021; KURTZEBORN; KWON; KUURE, 2019).

A ativação do receptor em determinado tecido pode causar uma série de alterações como modificação da transcrição gênica, regulação do ciclo celular, mecanismos envolvidos com a morte celular programada e neurogênese, etc e dessa forma produzir uma ampla variedade de comportamentos (BELL; ERICKSON; CARTER, 2014). É válido ressaltar ainda que as ações relacionadas a ocitocina e seu receptor não estão ligadas apenas ao encéfalo e útero, pois, os receptores ocitocinérgicos encontram-se distribuídos ainda nos rins, ovários e testículos, timo, coração, endotélio vascular, osteoclastos e mioblastos (VAIDYANATHAN; HAMMOCK, 2017).

Para produzir os variados comportamentos e efeitos relatados, a ocitocina precisa alcançar seus receptores, que como comentado, encontram-se distribuídos nas diversas regiões encefálicas. Uma vez sintetizada, as projeções dos neurônios magnocelulares encaminham a ocitocina para hipófise posterior (ou neuro-hipófise) e nesta região ela é armazenada em vesículas e posteriormente liberada na corrente sanguínea onde exercerá sua função hormonal nas regiões alvo (LEONG *et al.*, 2018). Entretanto, é importante notar que além dessa forma de comunicação clássica, hoje sabe-se que a ocitocina também exerce comunicação parácrina, sendo liberada pelos dendritos e soma dos neurônios magnocelulares do núcleo paraventricular e núcleo supraóptico em regiões adjacentes (ZHANG *et al.*, 2017). Além disso, estudos relatam ainda que o neuropeptídeo pode ainda apresentar comunicação autócrina, onde a ocitocina liberada interage com receptores ocitocinérgicos localizados nos próprios neurônios ocitocinérgicos (QUINTANA *et al.*, 2019).

As projeções aferentes dos núcleos secretores de ocitocina podem alcançar regiões do encéfalo, como amígdala, núcleo accumbens e hipotálamo (KOHLHOFF *et al.*, 2022). Dentre estas, a amígdala é uma região que apresenta grande densidade de receptores ocitocinérgicos e é uma área de íntima relação com a resposta de medo (KENDRICK; GUASTELLA; BECKER, 2018). Uma outra região importante na resposta e que também apresenta receptores ocitocinérgicos é o hipocampo, sendo

esta uma das mais importantes regiões envolvidas com processos relacionados a aprendizagem e memória (HAN *et al.*, 2019). Nesta região, juntamente com a amígdala e córtex, ocorrem mudanças sinápticas funcionais e estruturais que são importantes durante a codificação da informação obtida do ambiente (SHEPPARD *et al.*, 2018).

Os neurônios do núcleo paraventricular podem projetar-se ainda para a área tegmental ventral, interagindo com neurônios dopaminérgicos, levando a liberação de gaba e dopamina, sugerindo que a ocitocina pode modular atividade dopaminérgica. Nesse sentido, a ocitocina pode alterar comportamentos relacionados a recompensa levando a uma diminuição na busca de prazer, sendo esse comportamento muito envolvido com o sistema límbico juntamente com o núcleo accumbens. Neste núcleo a ocitocina pode atuar levando a diminuição da procura por alimentos baseado em recompensa (MAEJIMA *et al.*, 2018).

A ocitocina pode ainda agir sobre o sistema opióide e gerar eventos em cascata que podem agir como uma 'extensão' dos efeitos do neuropeptídeo por interagir com sistemas dopaminérgico, muscarínico e colinérgico, sistemas esses envolvidos com desordens psiquiátricas. No sistema dopaminérgico, receptores D2 podem ser modulados, e essa modulação está envolvida com mudanças que ocorrem em doenças psiquiátricas, já no sistema muscarínico a modulação pode levar a problemas associados a esquizofrenia e prejuízos cognitivos (QUINTANA *et al.*, 2019). A ocitocina pode ainda interagir com sistemas que regulam o eixo hipófise-pituitária-adrenal, apresentando efeito antiestresse e diminuindo a atividade basal do eixo (CARTER, 2017; JIANG *et al.*, 2018).

Corroborando todos esses achados sobre os efeitos da ocitocina no sistema nervoso central, trabalhos como os de Gimpl; Fahrenholz, (2001) e Jurek; Neumann, (2018) demonstram a maior ou menor densidade de receptores ocitocinérgicos em diversas regiões encefálicas e também entre espécies e os efeitos provenientes da ativação destes receptores. Jurek; Neumann, (2018), informa a densidade de receptores ocitocinérgicos encontrados em áreas envolvidas com a resposta de medo, como hipocampo, amígdala e córtex cingulado, enquanto que Gimpl; Fahrenholz, (2001) relatam o efeito da estimulação dos receptores em comportamentos do tipo ansioso e envolvidos com aprendizagem e memória, além de corroborar um ao outro em diversos aspectos.

Apesar dos efeitos centrais e periféricos da ocitocina, a maior parte do neuropeptídeo atuante é a sintetizada no sistema nervoso central, ou seja, sintetizada pelo núcleo paraventricular e núcleo supraóptico. A ocitocina produzida por tecidos fora do sistema nervoso apresenta baixa capacidade de se difundir através da barreira hematoencefálica, devido a sua natureza polar (LEE; JAYANT, 2019), sendo que apenas entre 1 a 2 % dessa produção consegue atravessar, de fato, a barreira (LEONG *et al.*, 2018). Quando há administração exógena, uma proporção ainda menor é relatada, estima-se que menos que 1% do hormônio consiga cruzar a barreira (MAEJIMA *et al.*, 2018).

Apesar dessa menor biodisponibilidade neural, a administração exógena de ocitocina tem sido amplamente utilizada em estudos realizados com humanos através das vias intranasal, intravenosa e oral. Nesse contexto se destacam por serem métodos menos invasivos. A via intravenosa apresenta dificuldades de entregar ocitocina no sistema nervoso por conta principalmente de sua meia vida de 22 minutos, que juntamente com a dificuldade de atravessar a barreira leva a um baixo fornecimento do peptídeo no encéfalo (AL-SUHAIMI *et al.*, 2021). A via oral apesar de ser mais prática para humanos, também apresenta dificuldade na entrega de altas concentrações de ocitocina no encéfalo. Nesta via, o processo digestivo tende a rapidamente degradar a ocitocina que, ocasiona baixa absorção e conseqüentemente menor disponibilidade sistêmica (LEE; JAYANT, 2019).

A exposição nasal de ocitocina é uma das que mais vem sendo estudada em humanos, apesar da biodisponibilidade ainda ser baixa, assim como as demais, nesta, estudos têm mostrado que a administração de altas doses não acarreta prejuízos aos indivíduos, com ou sem transtornos psiquiátricos, que receberam o hormônio. Além disso, a via de administração é uma forma pouco invasiva e de fácil aceitação a respeito dos efeitos da ocitocina em humanos (KENDRICK; GUASTELLA; BECKER, 2018). Estudos em animais também são realizados utilizando essa via e nestes foi possível verificar um aumento da ocitocina presente em regiões como hipocampo e amígdala após a administração nasal de ocitocina (YAMAMOTO; HIGASHIDA, 2020). Ainda em estudos animais, uma via de administração alternativa que é inviável em seres humanos é a infusão intracerebroventricular (LEONG *et al.*, 2018). Esta, dentre as relatadas, apresenta maior biodisponibilidade da ocitocina no encéfalo. Entretanto, como comentado os receptores ocitocinérgicos estão distribuídos em diversas regiões

do sistema nervoso central e a administração da ocitocina intracerebroventricular pode fazer esta a interagir com múltiplas áreas do sistema nervoso 'simultaneamente', comprometendo a interpretação do resultado obtido a depender do objetivo do estudo.

Neste caso, verificar uma resposta comportamental e afirmar que esta resposta está relacionada a estimulação ou inibição de uma região cerebral específica pode ser um erro, visto que o líquido cefalorraquidiano (que no caso carrega a ocitocina) pode levar ocitocina para todas as regiões encefálicas e levar a estimulação dos receptores ocitocinérgicos em todas estas. Uma possibilidade de diminuir a estimulação de áreas que não são de interesse é administrar a ocitocina diretamente na área que deseja realizar a avaliação, dessa forma a chance de entrega da concentração desejada do hormônio na área de interesse é aumentada, ao passo que diminui também as chances de entrega em áreas não desejadas.

2.2.2 Ocitocina e sua relação com memórias aversivas

Memórias aversivas são geradas a partir de uma ampla rede neuronal, que integra diferentes regiões encefálicas, responsáveis por organizar diversas respostas (MILTON, 2019), assim a resposta a um determinado estímulo aversivo pode envolver o sistema nervoso autônomo (alterando frequência respiratória e cardíaca), sistemas endócrinos (liberando cortisol e epinefrina), entre outros, visando com essa resposta frente ao estímulo manter a integridade do indivíduo frente a uma situação de ameaça (RABER *et al.*, 2019)

Entre as regiões que estão envolvidas com o processamento do medo e de ameaças, pode-se destacar o córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo, lócus cerúleos e substância cinzenta periaquedutal (PAG) (KORNHUBER; ZOICAS, 2019; RESSLER, 2020). A amígdala e todo o sistema límbico são apontados como regiões centrais de processamento de informações a respeito de memórias aversivas (DENARDO *et al.*, 2019). A amígdala é fundamental na detecção de ameaças e uma das responsáveis por organizar respostas de defesa pré-definidas (BREWIN, 2018).

A amígdala é dividida em basolateral e central. A basolateral é dividida em basal (BA) e lateral (LA). Já a amígdala central, se subdivide em amígdala central lateral (CeL) e amígdala central medial (CeM) (KLINGMÜLLER; CAPLAN; SOMMER, 2017).

Em relação ao medo condicionado, a amígdala lateral está envolvida na associação entre estímulo condicionado e estímulo incondicionado, bem como o armazenamento dessa informação (TRIANA-DEL RIO *et al.*, 2018). Para isso, a região recebe projeções de outras regiões envolvidas com a percepção desses estímulos, como tálamo e córtex. Na presença de um estímulo condicionado (som) e de um estímulo incondicionado (choque) o tálamo capta as informações auditivas e somatossensoriais e envia projeções para seus respectivos córtices. Estes, projetam-se para a amígdala lateral, na amígdala basolateral (SAMUEL *et al.*, 2018) (Figura 4).

RECALL

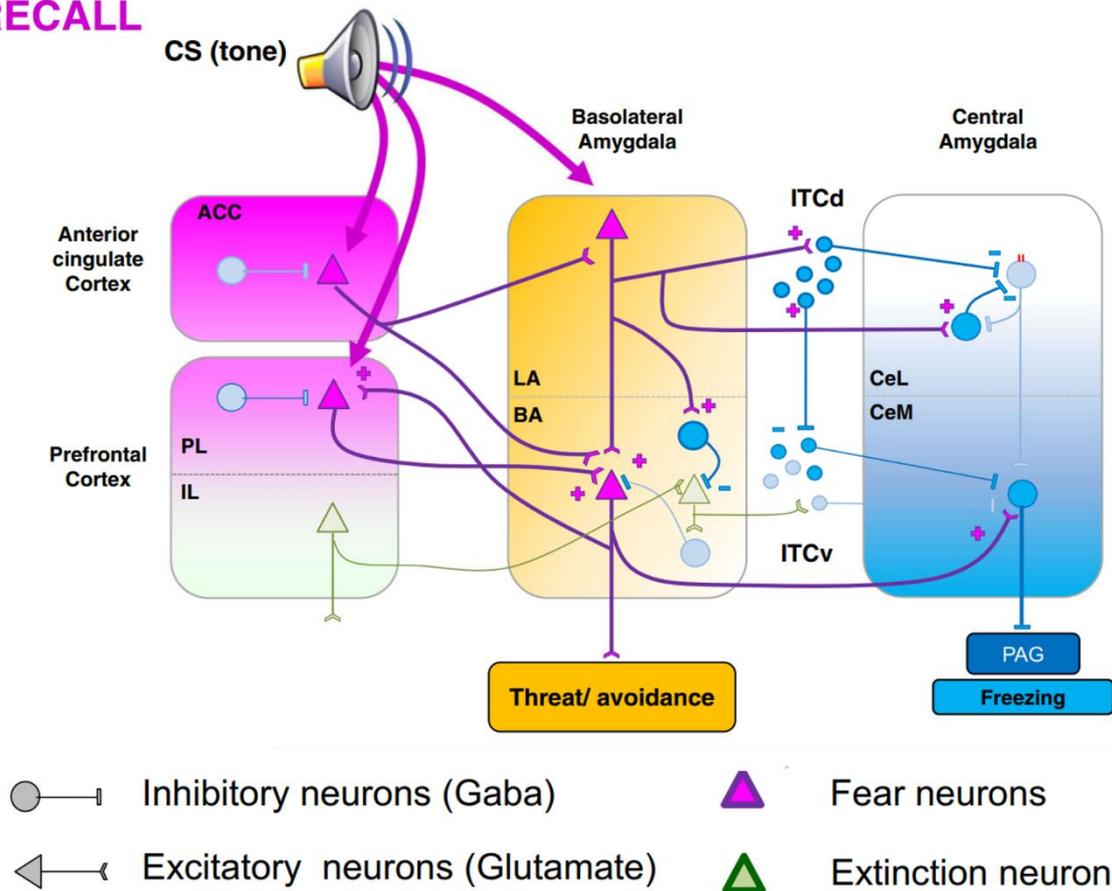


Figura 4. Representação esquemática das vias de comunicação entre córtex cingulado, córtex pré-frontal e amígdala. Retirado de Triana-Del Rio *et al.*, (2018).

A porção central da amígdala (CeA) é a principal via de saída da amígdala e comunica-se com regiões relacionadas predominantemente a respostas realizadas a partir de estímulos com potencial nocivo ao indivíduo (MAENG *et al.*, 2017). Amígdala central recebe a informação processada por basolateral e a transmite para os núcleos alvo (NEUGEBAUER, 2015). Dessa maneira, a amígdala central contribui fortemente para a aquisição e expressão de respostas envolvidas com o medo (DUVARCI; POPA;

PARÉ, 2011) (Figura 4).

Ambas porções de amígdala central recebem projeções vindas da basolateral, entretanto a principal via de saída da amígdala é a amígdala central medial, sendo esta responsável por enviar projeções de saída para outras regiões cerebrais como hipotálamo (resposta endócrina), mesencéfalo (resposta comportamental) e tronco encefálico (respostas autonômica) (COMERAS; HERZOG; TASAN, 2019). A porção lateral da amígdala central é a porção responsável por receber a maior parte das projeções relacionadas ao processamento nociceptivo e aversivo (NEUGEBAUER, 2015). Esta apresenta 2 populações de neurônios importantes na resposta ao medo, os chamados CeLon (ou PKC δ^-) e CeLoff (ou PKC δ^+), ambos neurônios gabaérgicos (Figura 5).

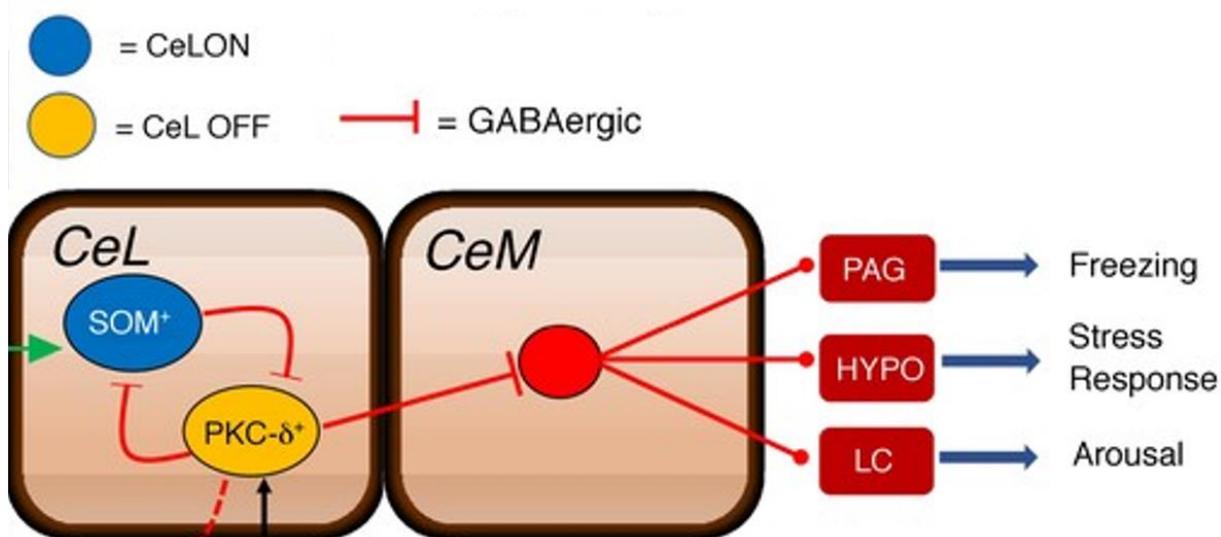


Figura 5. Representação esquemática da comunicação entre as porções lateral e medial da amígdala central. Adaptado de Ressler, (2020)

CeLon enviam projeções para CeLoff e na presença do evento aversivo condicionado CeLon são excitadas, isso leva a uma inibição de CeLoff, visto que CeLon apresenta neurônios gabaérgicos. Essa inibição, permite que o alvo de projeções de CeLoff permaneça ativo (assim como CeLon, CeLoff também apresenta

neurônios gabaérgicos) (THOMPSON; NEUGEBAUER, 2017). Como relatado, CeL (mais em específico CeLoff) envia projeções para a amígdala central medial e na situação de medo CeLoff encontra-se inibido. Dessa forma suas projeções gabaérgicas, que tem como alvo populações neuronais na amígdala central medial, deixam de afetar os neurônios deste núcleo (deixando-o ativo), pois CeLoff foram inibidas por CeLon. Dessa maneira, os neurônios gabaérgicos presentes na amígdala central medial permanecem ativos enviam projeções para diferentes áreas encefálicas, levando a diminuição da excitabilidade da região alvo e causando alterações comportamentais como comportamentos do tipo ansioso, indução de comportamentos relacionados a emoções negativas, etc (GE; CAI; PAN, 2022) (Figura 5).

Dessas projeções de saída, uma das possibilidades de alvo é o tronco encefálico, e neste um dos alvos pode ser a substância cinzenta periaquedutal que está envolvida com respostas autonômicas e a estímulos aversivos. Particularmente, essa região desenvolve papel na produção de um comportamento defensivo chamado congelamento, que consiste na pausa momentânea de todos os movimentos exceto os necessários para realizar a respiração ou ainda no desenvolvimento de respostas agressivas a depender da distância entre o indivíduo e a ameaça (MILTON, 2019). O processo todo ocorre da seguinte maneira: na presença do estímulo aversivo, as projeções inibitórias de CeLon chegam a CeLoff inibindo-as. Assim, os neurônios gabaérgicos de amígdala central medial, que receberiam o estímulo inibitório de CeLoff, permanecem ativos. Estes, enviam suas projeções também gabaérgicas para regiões alvo. No caso de substância cinzenta periaquedutal, esse estímulo inibitório vindo de amígdala central medial (agora ativo) o bloqueia e essa ação pode promover o comportamento de congelamento. Em condições de ausência de estímulos que causem medo, CeLon permanece inibido e essa inibição faz que CeLoff agora fique ativo, e cause a inibição de amígdala central medial e este, uma vez inibido, não inibe substância cinzenta periaquedutal e com este ativo o comportamento de congelamento não é produzido (Figuras 4 e 5).

Entre a basolateral e a amígdala central existem grupos celulares chamados de massa celular intercalada (ITC) (Figura 6). Estes, são aglomerados de neurônios gabaérgicos, que também estão envolvidos com a expressão e recuperação do episódio que cause medo por conta das comunicações que estes realizam tanto com

basolateral quanto com amígdala central medial. Esses aglomerados podem ainda estar mais localizados tanto dorsalmente quanto ventralmente. A massa celular intercalada dorsal é mais relacionada com a recuperação da memória aversiva, enquanto que a massa celular intercalada ventral é mais envolvida com a extinção da mesma. O primeiro envia projeções para tanto para CeLoff quanto para massa celular intercalada ventral, enquanto que este último projeta-se para amígdala central medial (MINAMI; KIYOKAWA; TAKEUCHI, 2019).

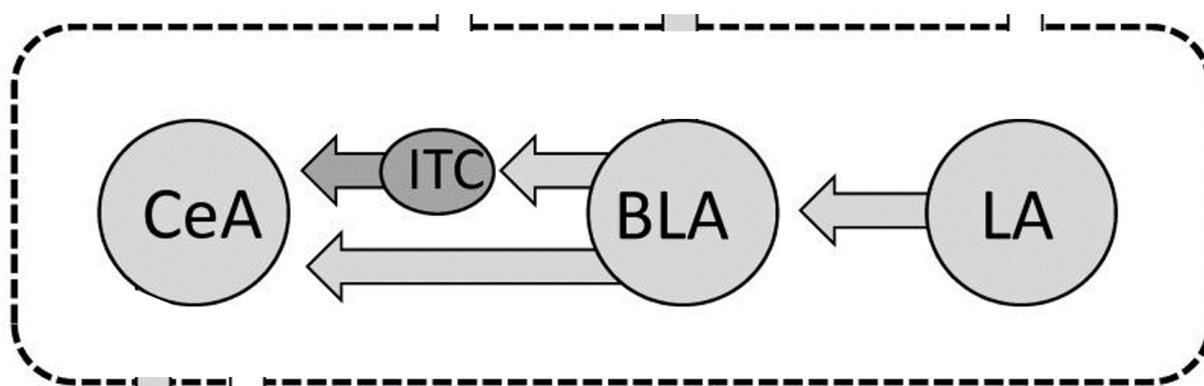


Figura 6. Representação esquemática da comunicação entre a massa celular intercalada e as porções basolateral e central da amígdala. Adaptado de Neugebauer, (2015)

Durante a expressão do comportamento de medo aprendido, a massa celular intercalada dorsal juntamente com CeLon inibem fortemente CeLoff gerando a cascata posteriormente relatada. Além disso, paralelamente às projeções de massa celular intercalada dorsal para a porção ventral inibem este grupo. Como este último também apresenta projeções inibitórias para a amígdala central medial, sua inibição faz que a esta porção da amígdala permaneça ativa, a qual bloqueia substância cinzenta periaquedutal causando comportamentos defensivos. Já na ausência do estímulo que cause medo, ocorre uma diminuição do tônus inibitório sobre CeLoff (por conta de menor ativação de CeLon e massa celular intercalada dorsal), ocasionando maior bloqueio de amígdala central medial que acarreta na não inibição de substância cinzenta periaquedutal, evitando assim os comportamentos defensivos característicos de respostas, frente a episódios que causem medo (Figura 4).

Partindo para a amígdala basolateral, uma vez ativa por meio de estímulos aversivos, ativa neurônios glutamatérgicos na amígdala lateral. Essa porção encontra-se intimamente envolvida com a resposta de medo, visto que funciona como um eixo

de integração de informações sensoriais, durante a resposta aversiva vindas do tálamo e córtex. Os neurônios aqui envolvidos com a experiência aversiva são em sua maioria excitados em resposta aos estímulos aversivos recebidos (JOSSELYN; FRANKLAND, 2018) (Figura 7).

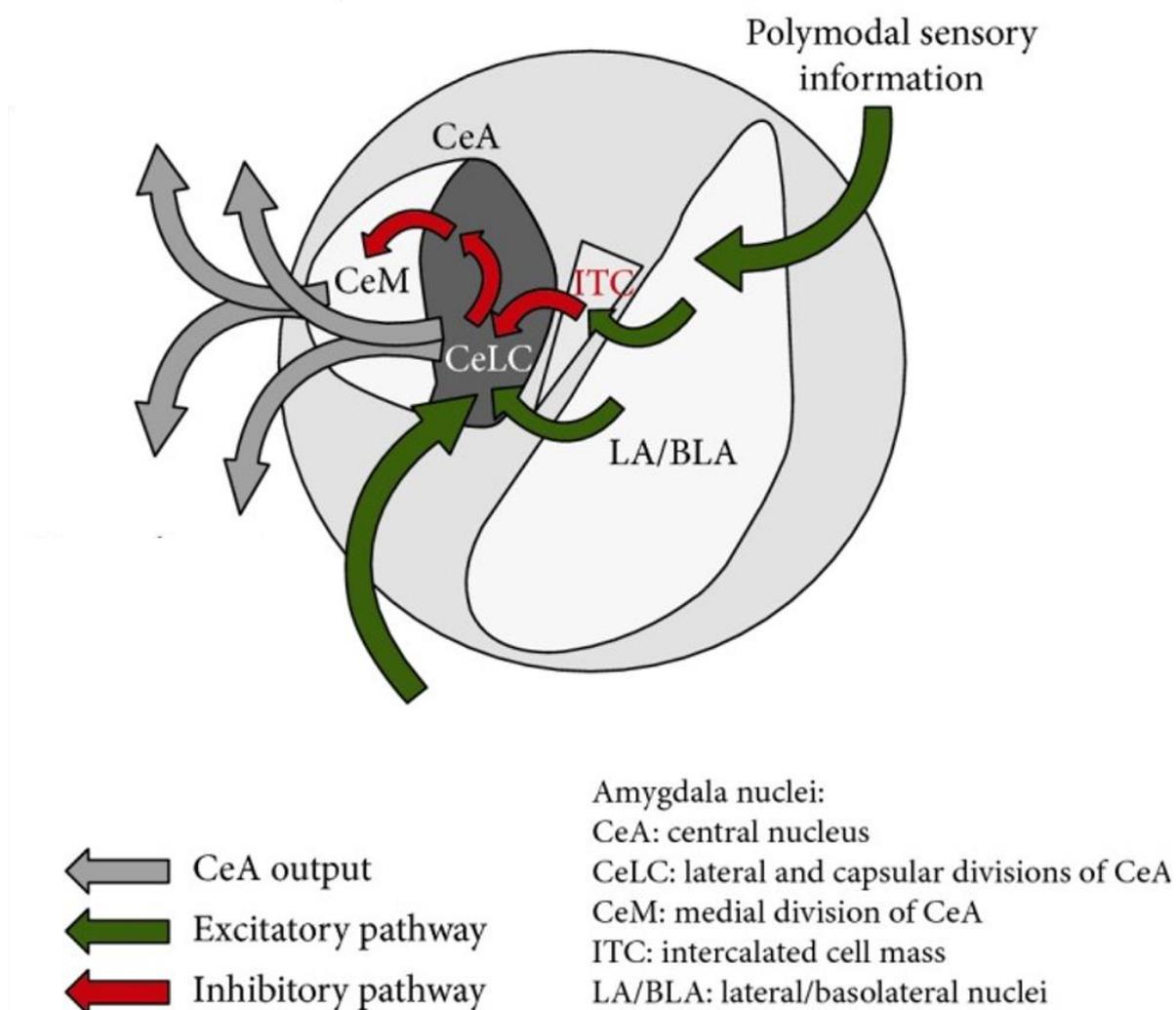


Figura 7. Representação esquemática da comunicação entre amígdala e massa celular intercalada durante a integração de informações sensoriais. Adaptado de Thompson; Neugebauer, (2017)

A amígdala lateral envia projeções excitatórias para CeLon na amígdala central, excitando-as e levando a inibição de CeLoff, como já comentado. Além disso, a amígdala lateral também envia projeções para massa celular intercalada dorsal, que também interage e inibe CeLoff, bem como projeta-se também para a amígdala basal (NEUGEBAUER, 2015). Esta porção, apresenta tanto neurônios excitatórios (envolvidos com a evocação e extinção de memórias aversivas), quanto inibitórios.

Estes últimos quando estimulados em situações que causam medo, causam inibição dos neurônios excitatórios, favorecendo a expressão do medo (TRIANA-DEL RIO *et al.*, 2018) (Figura 4).

Alternativamente, a estimulação dos neurônios excitatórios presentes na amígdala basal, causam a ativação de regiões como córtex pré-frontal que produzem respostas fisiológicas e comportamentais contra a ameaça, viabilizando a tomada de decisão, bem como o controle comportamental, através da informação processada na amígdala (NEUGEBAUER, 2015). Em complemento, os neurônios excitatórios da amígdala basal também se projetam para a amígdala central medial (CHOI *et al.*, 2021), ativando os neurônios inibitórios dessa região, que uma vez estimulados inibem substância cinzenta periaquedutal (Figura 4).

Nos roedores, Milton, (2019) comenta que os córtices pré-límbico e infralímbico são os responsáveis pelos eventos de consolidação, recuperação e extinção de memórias aversivas. O pré-límbico está mais envolvido com a expressão e evocação da memória aversiva (Figura 4), enquanto que o infralímbico é mais requerido durante o processo de extinção da memória aversiva ou ainda na expressão de uma memória de extinção (VARGAS; LIMA; MELLO-CARPES, 2021) (Figura 8). Essa diferenciação ocorre principalmente por conta do padrão divergente de conexões que estas regiões realizam com a amígdala basolateral e de como o estímulo aversivo é interpretado durante a evocação ou extinção.

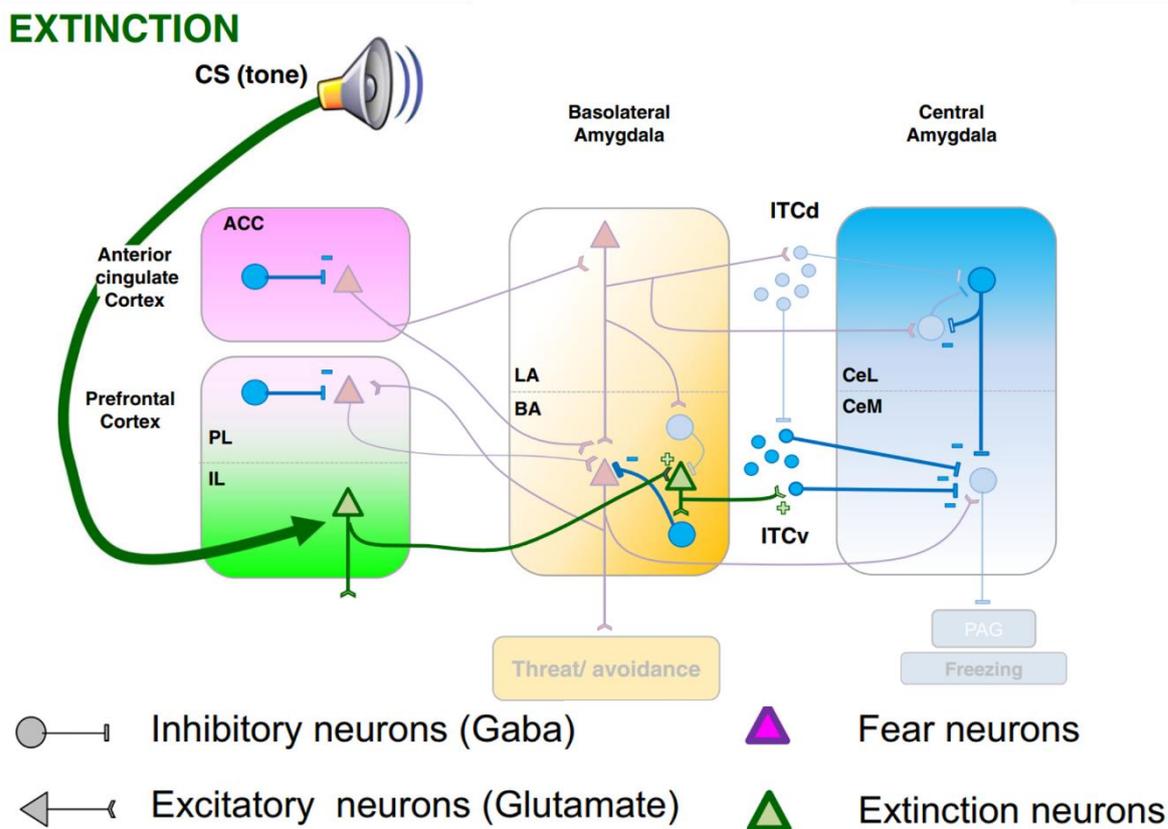


Figura 8. Representação esquemática do envolvimento do córtex infralímbico com o processo de extinção de memórias aversivas. Adaptado de Triana-Del Rio *et al.*, (2018)

O pré-límbico apresenta um grupo de neurônios gabaérgicos que realizam uma inibição tônica de grupos de neurônios excitatórios também presentes nessa região. Esses neurônios excitatórios são responsáveis pelas principais vias de saída (envolvidas com o medo condicionado) dessa região para a amígdala. Em situações aversivas, há um aumento na estimulação dos neurônios excitatórios do pré-límbico, que supera o tônus inibitório, causado pelos gabaérgicos, levando ao aumento da estimulação da amígdala. Essa estimulação por sua vez, ocasiona um feedback excitatório no pré-límbico favorecendo a expressão do medo (THOMPSON; NEUGEBAUER, 2019). Alternativamente, durante a extinção de memórias aversivas, o infralímbico parece ser mais requerido. Isso ocorre, porque a estimulação desse centro pode ocasionar inibição de regiões envolvidas com a produção da resposta frente ao estímulo aversivo, como a amígdala basal (ALEXANDRA KREDLOW *et al.*, 2022). Diante disso, percebe-se que a modulação do pré-límbico e infralímbico pode alterar o estado excitatório/inibitório nas da amígdala, ocasionando o favorecimento da recuperação ou da extinção da memória aversiva (Figura 8).

Outra região envolvida com as memórias aversivas é o córtex cingulado anterior. Juntamente com amígdala e hipocampo, a região é altamente requisitada durante o aprendizado e a expressão do medo (BLISS *et al.*, 2016). Durante a experiência aversiva, os neurônios presentes no cingulado são ativos e atuam tanto na expressão quanto na recuperação dessa memória (RESSLER, 2020). Uma vez exposto ao estímulo aversivo, o cingulado capta pistas relacionadas à ameaça, vindas de regiões como córtex pré-frontal e tálamo, e envia projeções glutamatérgicas para amígdala basolateral (tanto para a amígdala basal quanto para amígdala lateral), ativando neurônios excitatórios relacionados à expressão do medo nessa região e ocasionando a ativação de toda a cascata de eventos relatada (KEUM; SHIN, 2019) (Figura 4).

Conhecendo como o sistema que envolve a formação de memórias aversivas funciona, pode-se discorrer como a ocitocina atua neste processo. Já é relatado na literatura que a ocitocina pode modular comportamentos em roedores de maneira semelhante ao observado em humanos (KEUM; SHIN, 2019), entretanto é válido ressaltar que apesar de haver essa similaridade, também existem diferenças de efeitos e vias de ação entre diferentes espécies. Em complemento, a grande variedade de regiões que expressam receptores ocitocinérgicos, juntamente com a expressão desses receptores em neurônios tanto glutamatérgicos quanto gabaérgicos e a variação do tipo de receptor de ocitocina, além da variação desses parâmetros entre as espécies, podem inicialmente prejudicar estudos que pretendam translacionar resultados (ALTHAMMER; JIRIKOWSKI; GRINEVICH, 2018).

Durante a recuperação de uma memória aversiva, na presença da ocitocina, o estímulo que desencadeia a resposta ao medo ocorre como já comentado (a citar, ativação dos neurônios em córtex cingulado anterior, pré-límbico e amígdala lateral). Entretanto, existem receptores ocitocinérgicos tanto no cingulado quanto na amígdala sugerindo efeitos do neuropeptídeo sobre respostas ao medo, a consolidação de memórias ou ainda respostas relacionadas a aproximação ou afastamento da ameaças (YAMAGISHI; LEE; SATO, 2020). Em complemento, estes comportamentos podem estar ainda envolvidos com comportamentos relacionados à aprendizagem que podem ser afetados pela ocitocina (SUE CARTER *et al.*, 2020). Corroborando a isso, estudos relatam que baixos níveis de ocitocina também têm sido relacionados com déficits de atenção, sugerindo assim problemas relacionados a aprendizagem

(KOHLEHOF *et al.*, 2022) (Figura 9).

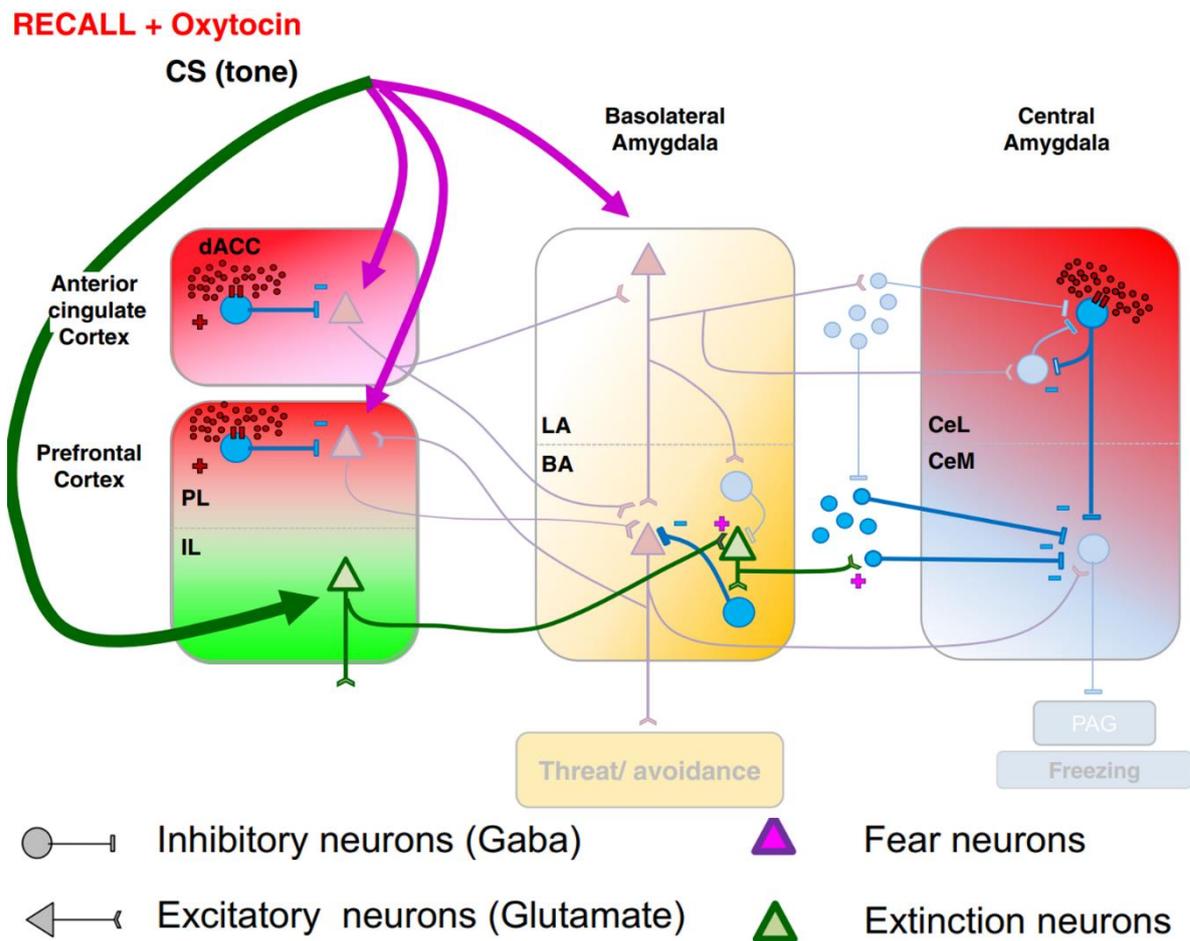


Figura 9. Representação esquemática da ação da ocitocina sobre núcleos envolvidos com a resposta ao medo. Adaptado Triana-Del Rio *et al.*, (2018)

No córtex cingulado anterior, a infusão da ocitocina possibilitou a diminuição da resposta ansiosa em roedores, tanto por ação direta na região, quanto através de modulação de interneurônios (LI *et al.*, 2021). Ainda, durante a evocação de uma memória aversiva, a ocitocina interage com neurônios gabaérgicos presentes no córtex cingulado anterior e no córtex pré-límbico estimulando-os. Esta estimulação tem como consequência o aumento da inibição da amígdala. Com a diminuição da atividade da amígdala durante a evocação, a ação do córtex infralímbico sobre a amígdala é facilitada. Esta região é mais envolvida com a extinção de memórias, pois envia projeções glutamatérgicas para neurônios da amígdala basal, que por sua vez ativam neurônios gabaérgicos no mesmo local e por fim diminuem a excitabilidade da amígdala, facilitando a extinção da memória. Paralelamente, a ocitocina pode ainda

interagir com as CeLoff ativando-as. Esta estimulação leva a inibição de núcleos gabaérgicos na amígdala central medial e como consequência faz com que regiões que eram alvo das projeções da amígdala permaneçam livres, diminuindo a resposta ao estímulo aversivo (TRIANA-DEL RIO *et al.*, 2018) (Figura 9).

Além disso, os receptores ocitocinérgicos também estão presentes na amígdala central. Na porção lateral desta, a presença da ocitocina modula negativamente a expressão do medo, interagindo com CeLoff, que leva a inibição de neurônios presentes na amígdala central medial. Dessa forma, a amígdala central medial é controlada indiretamente pela ocitocina que interage com os neurônios gabaérgicos da amígdala central lateral (NEUGEBAUER *et al.*, 2020). A inibição dessas projeções de saída da amígdala pode assim promover efeito ansiolítico e possibilitar estados emocionais positivos em roedores (WAHIS *et al.*, 2021) (Figura 9).

2.2.3 Ocitocina hipocampal e modulação de memórias aversivas

O hipocampo de roedores pode ser dividido em 2 porções, uma localizada mais dorsalmente (e mais posteriormente em primatas) e outra localizada mais ventralmente (e anteriormente em primatas). A porção ventral é mais relacionada a questões afetivas e emocionais, enquanto que a porção dorsal está mais envolvida com o processamento do contexto no qual uma memória aversiva está sendo formada (BIAN *et al.*, 2019). Em complemento, o hipocampo pode ainda estar envolvido com a modulação de respostas a ameaças durante a extinção de memórias, devido a sua interação com córtex pré-frontal, que serve como regulador de comportamentos.

O hipocampo e o córtex pré-frontal avalia o contexto da ameaça atual, juntamente com experiências previamente armazenadas e direcionam o comportamento a ser executado, buscando a integridade do indivíduo (ALEXANDRA KREDLOW *et al.*, 2022). Dessa forma, o hipocampo pode atuar tanto durante a formação de uma memória aversiva, quanto contribuindo para a extinção da memória, juntamente com outras regiões (MILTON, 2019). A inibição do hipocampo em roedores antes do treino de extinção de memória aversiva, pode ocasionar a diminuição da extinção do medo, ou seja, se o hipocampo permanecer ativo durante o treino de extinção de memória, a expressão da extinção da memória aversiva pode ser facilitada (RABER *et al.*, 2019).

Nesse sentido, a ocitocina pode causar excitação hipocampal, que pode favorecer um potencial de longa duração acarretando em mudanças comportamentais (ÇALIŞKAN; ŞAHIN; GÜLDAĞ, 2021). Em linha, estudos relatam a presença de receptores ocitocinérgicos excitatórios no hipocampo em neurônios gabaérgicos da região. Dessa forma, a entrega da ocitocina no hipocampo pode ocasionar a inibição de núcleos que recebem projeções deste (LEONG *et al.*, 2018). Alternativamente, também é relatado a existência de receptores ocitocinérgicos em neurônios excitatórios do hipocampo dorsal (LIN; HSU, 2018). Além disso, o hipocampo dorsal de roedores (e todas suas subdivisões: CA1, CA3 e giro denteado) apresentam alta densidade de receptores ocitocinérgicos (JUREK; NEUMANN, 2018). Dessa maneira, apesar da possibilidade de a ocitocina afetar o hipocampo, ainda não é claro como isso ocorre, o que possibilita diferentes frentes de pesquisa.

Vale ressaltar que apesar do envolvimento do hipocampo com áreas como córtex pré-frontal, amígdala e córtex cingulado, ele por si só pode processar e formar uma memória, independente das demais áreas (SAMUEL *et al.*, 2018), podendo inclusive ser suficiente na atualização de uma memória já armazenada (KLOOSTER; TRANEL; DUFF, 2020). Numa situação de atualização de uma memória aversiva, na ausência de um estímulo aversivo, pode haver um aumento de atividade hipocampal, na qual o indivíduo reconhece inicialmente o determinado contexto como aversivo. Entretanto, novas informações são interpretadas como seguras e adicionadas ao contexto inicial levando a reconsolidação de memórias sobre um novo contexto menos aversivo (BREWIN, 2018).

Entre as vias de comunicação que ligam o hipocampo às áreas já comentadas, umas das principais é através do córtex entorrinal. Juntamente com o hipocampo, durante a formação e a evocação de memórias, o córtex entorrinal também é ativado no processo, conectando o hipocampo ao córtex pré-frontal, levando informações que serão processadas e integradas nesta região (LEWIS, 2017; SEKERES; WINOCUR; MOSCOVITCH, 2018). Para isso, o córtex entorrinal apresenta conexões que levam informações de regiões neocorticais como córtex pré-frontal, córtex parietal e córtex temporal para o hipocampo e de volta para as regiões de origem (SCHULTZ; ENGELHARDT, 2014) (Figura 10).

As informações vindas do neocórtex e do córtex entorrinal chegam ao hipocampo e seguem uma via de comunicação do próprio hipocampo, onde o giro

denteado recebe as projeções do córtex entorrinal, do giro passa por CA3, 2 e 1 para voltar ao córtex entorrinal (ROY *et al.*, 2017). Paralelamente, CA3 pode ainda projetar-se para áreas subcorticais ou ainda diretamente para CA1 (EICHENBAUM, 2017b) (Figura 10). Essa circuitaria envolvendo o córtex entorrinal e hipocampo pode ser tratada como um dos principais centros de modulação de memórias, visto que a estimulação do córtex entorrinal tem potencial de facilitar processos envolvendo aprendizagem e memórias (KIM; PARK, 2021).

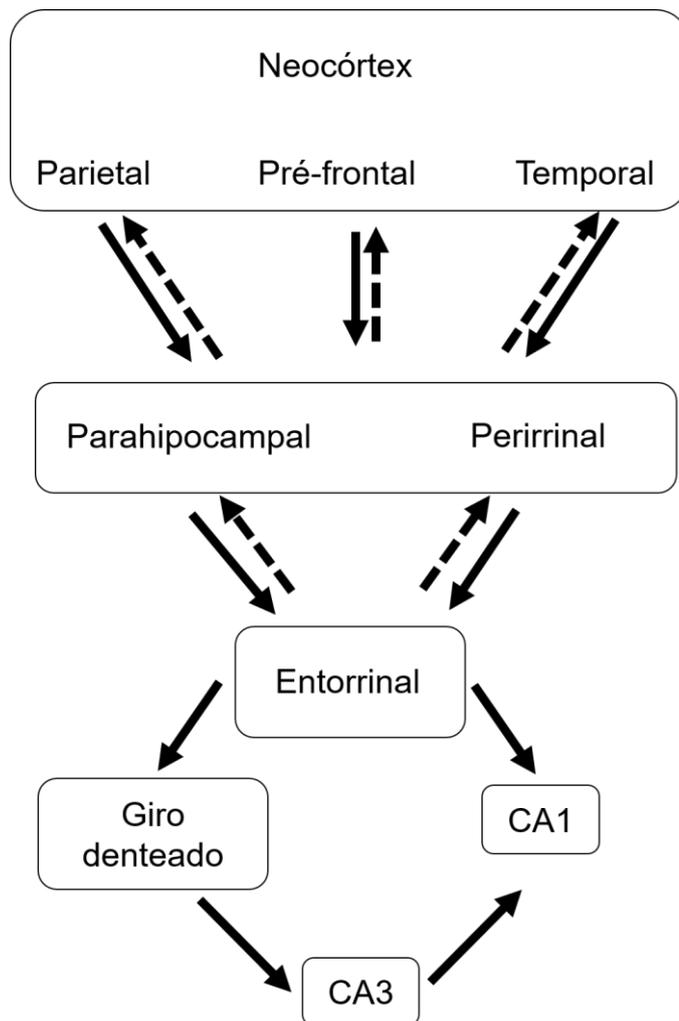


Figura 10. Representação esquemática da comunicação entre hipocampo e neocórtex. Adaptado de Schultz; Engelhardt, (2014)

Os estudos do envolvimento do hipocampo com diferentes fases da formação de memória têm sido amplamente desenvolvidos em roedores machos. Entretanto pouco se sabe se esses sistemas se comportam de maneira semelhante em fêmeas ou se são modulados durante as variações hormonais que ocorrem no ciclo

reprodutivo, e menos ainda se hormônios como a ocitocina alteram essa possível modulação (MAENG *et al.*, 2017). Dessa forma, a entrega (ou não) da ocitocina no hipocampo pode modular a transmissão sináptica e a plasticidade.

No estudo realizado por Li *et al.* (2021) em roedores, a ocitocina administrada no córtex cingulado anterior levou a uma diminuição do potencial de longa duração inicial, causando diminuição de respostas ansiosas e interferência entre as taxas de excitação e inibição de núcleos envolvidos com a resposta como cingulado, hipocampo e núcleo accumbens. Em linha, o estudo de Hasan *et al.* (2019) também realizado em roedores, relata que a ocitocina liberada na amígdala pode causar efeito ansiolítico. Em complemento, reportaram que estimulação optogenética de neurônios ocitocinérgicos causou diminuição do medo relacionado ao contexto, ao passo que o silenciamento desses neurônios ocasionou prejuízo na extinção da memória aversiva.

No estudo de Lee *et al.* (2015) realizando a tarefa de labirinto aquático, o trabalho mostrou que em situações de estresse há um prejuízo na memória, mas que a ocitocina intranasal preveniu a perda de performance na tarefa, além de promover plasticidade hipocampal. A ocitocina pode demonstrar ainda efeito no comportamento motivacional dos animais e esse efeito é sexo-dependente. Liu *et al.* (2020) demonstrou em seu trabalho que doses maiores de ocitocina administrada intracerebroventricular, são requeridas para diminuir a busca por alimento em ratas, enquanto que em ratos doses mais baixas já causam esse efeito, além de nestes o efeito perdurar mais que em fêmeas. Nessa mesma linha, Zhou *et al.* (2015) verificou resultado oposto onde os animais machos buscam mais por alimento se comparados às fêmeas, entretanto, neste a via foi intraperitoneal, sinalizando que a via de administração pode levar a visualização de efeitos distintos.

Ainda no estudo de Zhou *et al.* (2015) foi demonstrado que a ocitocina pode alterar a atividade motora. O estudo mostrou que animais do sexo feminino numa baixa dose de ocitocina apresenta diminuição da atividade motora, ao passo que para animais do sexo masculino apenas doses altas podem causar o efeito citado. Em complemento, no estudo realizado por Bowen *et al.* (2015), os autores mostraram que no prejuízo motor causado pela administração de etanol, a ocitocina é capaz de atenuar a perda da performance nos testes de: suspensão no fio, reflexo de endireitamento e campo aberto. Em síntese, percebe-se que existem achados na literatura verificando os efeitos da ocitocina nos comportamentos citados. Entretanto,

ainda não é claro os efeitos da ocitocina administrada diretamente no hipocampo sobre a aprendizagem, a memória aversiva ou comportamento de resposta a este tipo de estímulo.

Diante do exposto, uma melhor compreensão dos efeitos da ocitocina no hipocampo sobre a memória e comportamentos do tipo medo/ansioso se faz necessária, visando entender também como a ocitocina hipocampal interage com outras áreas relacionadas a memória e medo, além de contribuir na busca futura por formas alternativas e/ou complementares de auxiliar nos tratamentos de transtornos mentais como transtornos de pânico, fobias entre outros.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Influência da ocitocina hipocampal, durante a aquisição, consolidação e evocação de uma memória aversiva em ratas

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar se a administração de ocitocina no hipocampo de ratas é capaz de alterar o processo de aprendizagem de uma memória aversiva;
- Examinar a repercussão da modulação ocitocinérgica no hipocampo sobre a aquisição, consolidação e evocação de memórias aversivas em ratas;
- Avaliar os padrões de imunorreatividade para C-Fos no hipocampo, amígdala, córtex cingulado, córtex pré-límbico e córtex infralímbico em uma tarefa de memória aversiva, após modulação ocitocinérgica no hipocampo de ratas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 99 animais da espécie *Rattus norvegicus* heterogênicos da linhagem Wistar, fêmeas, pesando entre 200 e 300 gramas com 5-7 meses, provenientes do biotério setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Sergipe. Os animais foram mantidos no biotério alojados em gaiolas (33 x 40 x 17 cm), com 3 a 4 animais por gaiola. Os mesmos foram mantidos sob ventilação e temperatura controladas ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12h/12h e acesso livre à água e comida.

Os animais utilizados neste estudo foram tratados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela lei brasileira para o uso de animais em pesquisas nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca) e Resolução Normativa CONCEA 26/2016 sob o protocolo CEUA nº 4737270122 (Anexo). Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais usados e o seu sofrimento.

4.2 DROGAS

Foram utilizadas as seguintes drogas: Pentabiótico veterinário (Penicilina G Benzatina®, Ariston / 120000 UI em 0,2 ml; Banamine (Flunixin meglumina); Cloridrato de cetamina (Ketamina®, Agener União); Cloridrato de xilazina (Calmiun®, Agener União); Cloridrato de lidocaína 2%; Dimetilsulfóxido (DMSO Sigma-Aldrich); Ocitocina (Farmacêutica Brasil).

4.3 PROCEDIMENTOS GERAIS

Os animais foram submetidos a um período de 5 minutos de manipulação, diariamente, durante 5 dias antes do início dos experimentos. A finalidade desse procedimento foi habituá-los ao toque e à presença do experimentador, além de

reduzir possíveis alterações comportamentais decorrentes do estresse causados pelo contato e presença de pessoas durante o experimento, como descrito por Santos *et al.* (2013).

Todos os experimentos foram realizados, preferencialmente, no mesmo horário (12:00 – 16:00 p.m.). Entre as sessões no teste comportamental o aparato foi limpo com uma solução de etanol a 10% para evitar possíveis pistas de odores deixadas por outro animal.

A preparação da ocitocina foi realizada dissolvendo 1 mg em 200 uL de DMSO 80%, uma vez dissolvida, da solução obtida foram adicionados adicionamos 300 uL de água para injeção e nesse preparo obtivemos uma solução estoque de 500 uL a uma concentração de 2 µg/µL. A solução administrada nos animais do grupo controle consistiu apenas na combinação de DMSO e água, na mesma proporção citada (LAHOUD; MAROUN, 2013; NAGAYOSHI *et al.*, 2017).

Após a realização de todas as etapas experimentais, os animais foram eutanasiados através do uso de sobredose de ketamina e xilazina. Uma vez que os animais não apresentaram sinais vitais como imobilidade, perda da coloração ocular, ausência do reflexo de dor (pinça pressionada entre os dígitos), ausência de batimentos cardíacos e de movimentos respiratórios estes são considerados eutanasiados e afim de certificar a eutanásia dos animais, foi realizado o deslocamento cervical destes.

4.3.1 Monitoramento do ciclo estral

Para realização deste procedimento foi utilizada uma pipeta de Pasteur de polietileno (3 ml) com um volume aproximado de 0,3 ml de solução salina 0,9% em sua ponta. Para coleta do material, a ponta da ponteira foi introduzida no orifício vaginal, com cuidado para não estimular a cérvix uterina. Uma gota de solução salina foi injetada, aspirada e colocada em uma lâmina. A este material foi adicionada uma gota de azul de toluidina para visualização do ciclo estral ao microscópio, com magnificação de 10 ou 40 vezes (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). O procedimento foi realizado por 5 dias após o período de recuperação pós-operatório das ratas. Esse monitoramento é de grande importância para o trabalho visto que

alterações hormonais que ocorrem durante o ciclo estral podem interferir nos resultados obtidos.

Por esse motivo, com base no resultado do esfregaço do último dia experimental (nos diferentes desenhos experimentais), as ratas foram separadas em 2 grandes grupos a depender da fase estral que se encontram neste dia. O primeiro grupo foi composto por fêmeas na fase de proestro e estro que foi chamado 'ES' e o segundo grupo composto por ratas nas fases de metaestro e diestro que foi chamado 'DI'. A divisão foi realizada dessa forma pela similaridade dos tipos celulares presentes nas fases. Em complemento, a fase de ovulação ocorre do início do proestro ao final do estro (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Para auxiliar no processo de identificação utilizamos a ferramenta apresentada por Byers *et al.* (2012) (Figura 3).

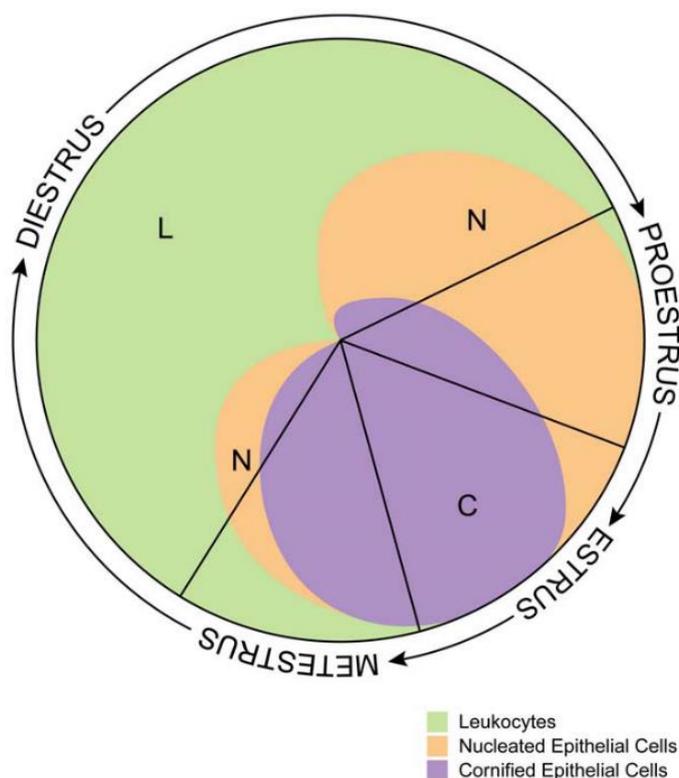


Figura 11 - Tipos celulares encontrados nas fases do ciclo estral (Retirado de Byers *et al.* (2012))

Após a realização do último esfregaço (1 hora após, afim de evitar estresse nos animais) as ratas foram levadas para a realização da tarefa comportamental no labirinto em cruz modificado e nesse ponto ocorreu a diferenciação dos 3

experimentos realizados. A seguir, a figura 4 mostra exemplos de imagens obtidas pela equipe através do monitoramento do ciclo estral.

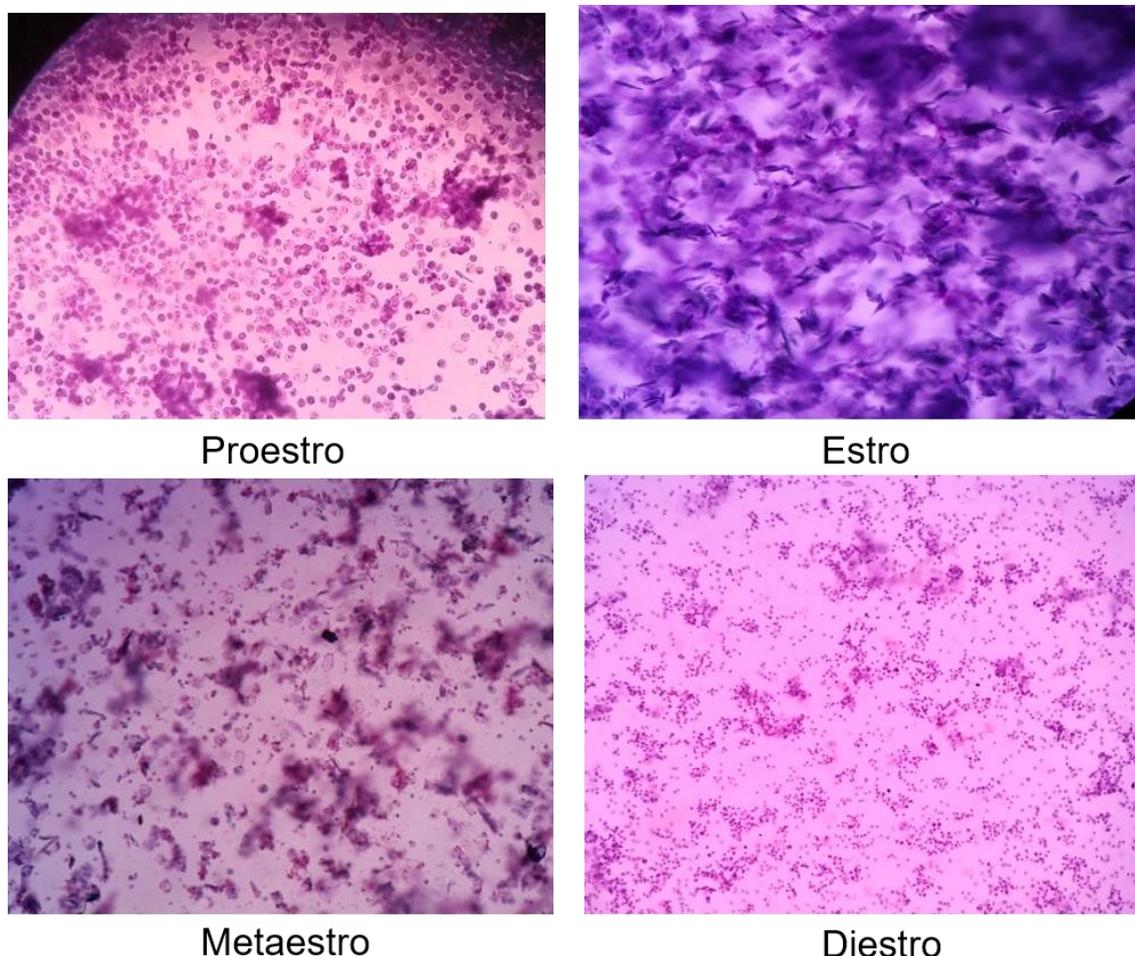


Figura 12 - Imagens representativas das fases do ciclo estral (acervo próprio)

4.3.2 Cirurgia estereotáxica

Para a realização da cirurgia estereotáxica os animais precisaram ser preparados. Inicialmente os animais foram pesados para calcular a quantidade de anestésico a ser utilizado [cetamina (100 mg/kg, i.p.) e cloridato de xilazina (10 mg/kg, i.p.)]. Os mesmos são anestesiados com 70% do volume total e não havendo resposta ao estímulo doloroso (realização do movimento de pinça entre os dígitos do animal), os animais foram submetidos à tricotomia da parte superior da cabeça e fixado no aparelho estereotáxico através dos incisivos e das barras auriculares (Figura 5). Uma vez fixados, realizamos assepsia da região superior do crânio com uma solução de

álcool iodado, seguido de administração subcutânea de lidocaína 2%, administrada para anestesia local.

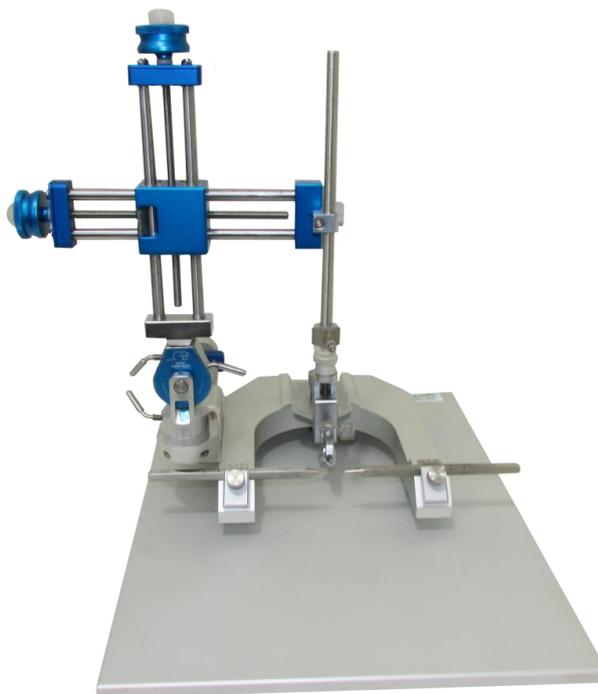


Figura 13 - Aparelho estereotáxico (fonte: www.insightltda.com.br)

Em seguida, foi feita uma incisão longitudinal na região superior da cabeça foi realizada com o auxílio de um bisturi e então os tecidos foram afastados, expondo os ossos do crânio. Após isso, o aparelho estereotáxico foi ajustado para as medidas obtidas com o auxílio do atlas Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2014), tendo o hipocampo como alvo e utilizando o bregma como ponto de referência para iniciar o ajuste. As seguintes medidas foram obtidas: anteroposterior, -3,48 mm; mesolateral do hemisfério direito e esquerdo: +2,5 mm e -2,5 mm respectivamente; dorsoventral, -2.0 mm (Figura 6).

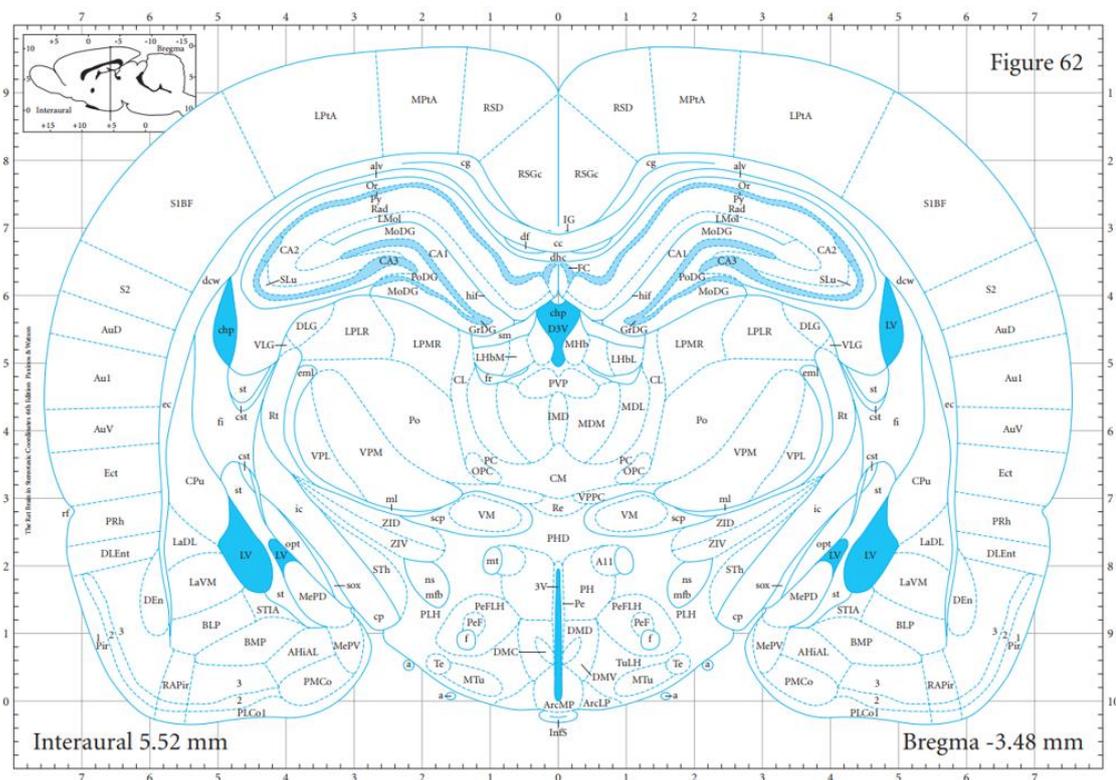


Figura 14 - Imagem de um corte encefálico de rato retirado de Paxinos e Watson (2014).

Após o ajuste do equipamento para as medidas citadas, os animais receberam os 30% restantes do volume total de anestésico e o crânio deste foram perfurados com o auxílio de uma broca odontológica, no qual foram feitos 4 pontos de perfuração, dois para a alocação de cânulas guia de aço inoxidável (uma em cada hemisfério com 14 milímetros cada) para a administração de fármacos no hipocampo (Figura 13) para a inserção de dois parafusos de aço inoxidável, que são utilizados afim de melhorar a adesão do capacete (nome dado a toda estrutura alocada sobre o crânio). Além disso, toda a estrutura foi fixada com resina acrílica de uso odontológico.

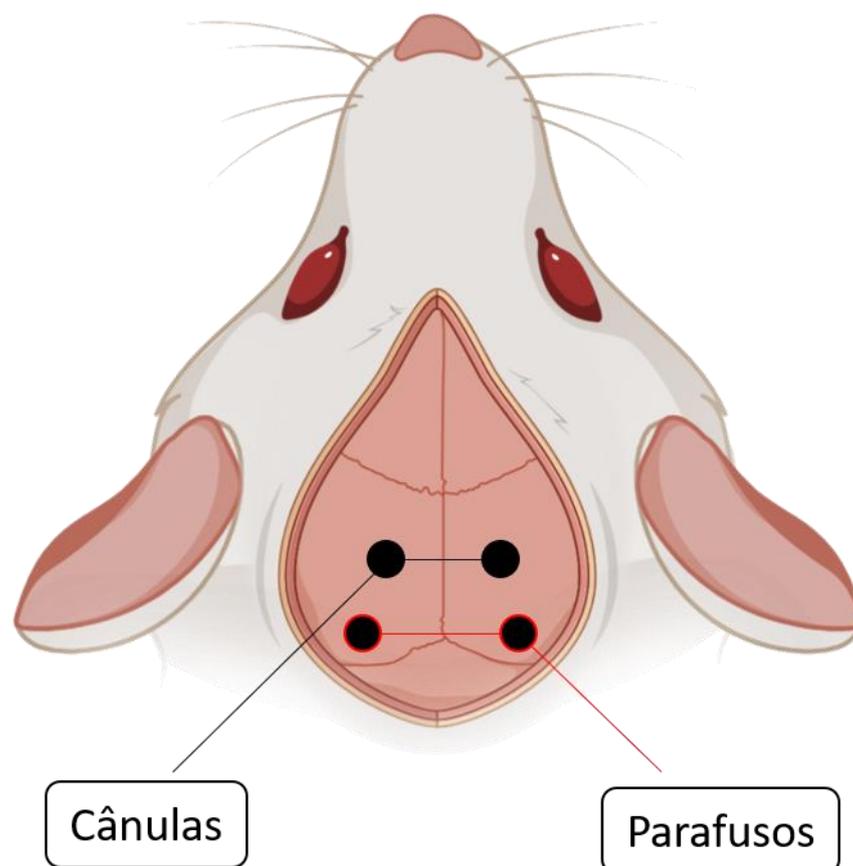


Figura 15 - Representação esquemática dos pontos de perfuração no crânio das ratas (modificado de <https://www.biorender.com>)

Afim de evitar o contato direto do encéfalo com o meio externo através das cânulas, foi adicionado um fio metálico de aço inoxidável (chamado mandril) com o mesmo comprimento da cânula guia. O mandril, além de limitar esse contato direto com o meio, auxilia também na prevenção do entupimento das cânulas e evitar infecção. O fio é fixado ao capacete utilizando-se igualmente da resina odontológica previamente relatada (Figura 15).

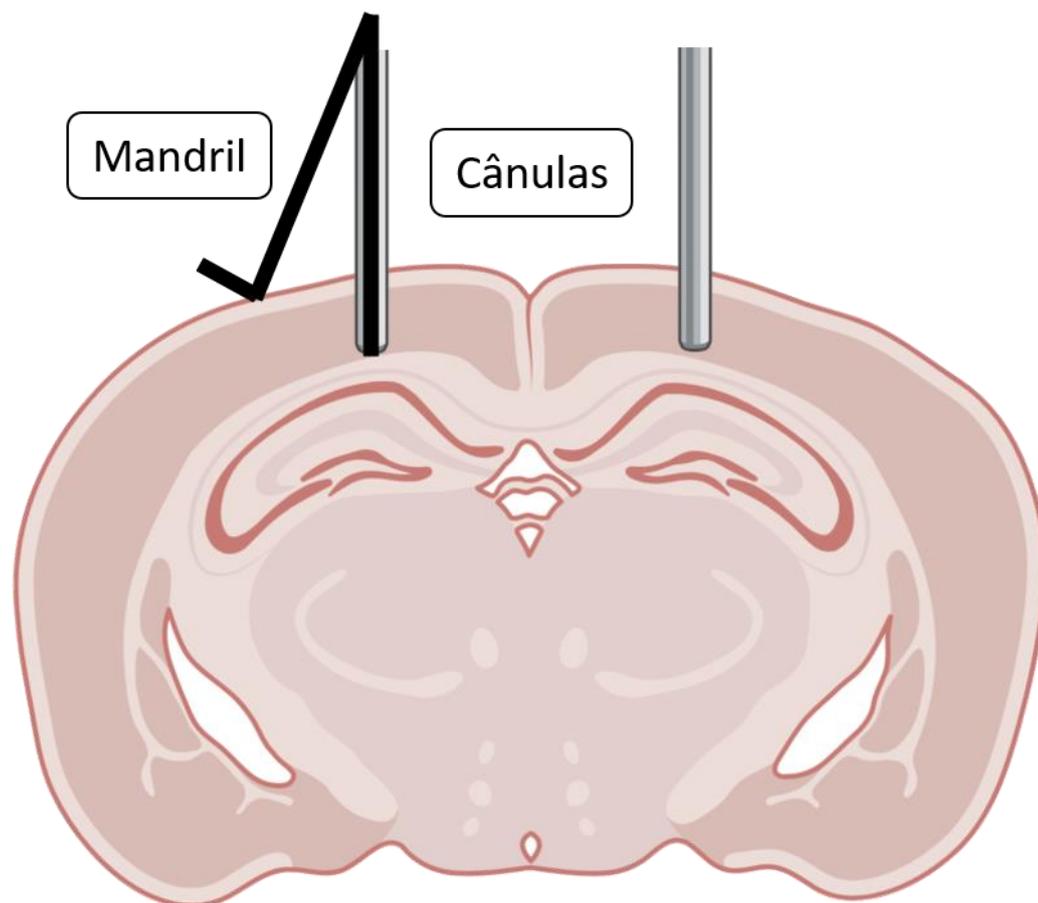


Figura 16 - Representação esquemática da alocação da cânula e mandril (modificado de <https://www.biorender.com>)

Ao término do procedimento cirúrgico, os animais receberam 0,1 ml de pentabiótico veterinário (Penicilina G Benzatina®, Ariston / 120000 UI em 0,2 ml) via intramuscular, seguido de injeção do analgésico banamine (flunixinina meglumina) 1,1 mg/kg, via subcutânea, ambos administrados imediatamente após a cirurgia. Além disso, uma segunda dose de banamine foi administrada 24 horas após a primeira. Após a primeira administração do banamine, os animais foram alocados numa placa de quente a 22°C e observados por volta de duas horas. Ao despertarem, os mesmos foram individualmente alocados em caixas plásticas e monitorados por mais 2 horas após a cirurgia e então retornaram para suas gaiolas originais e foram observados durante 24 horas após a cirurgia.

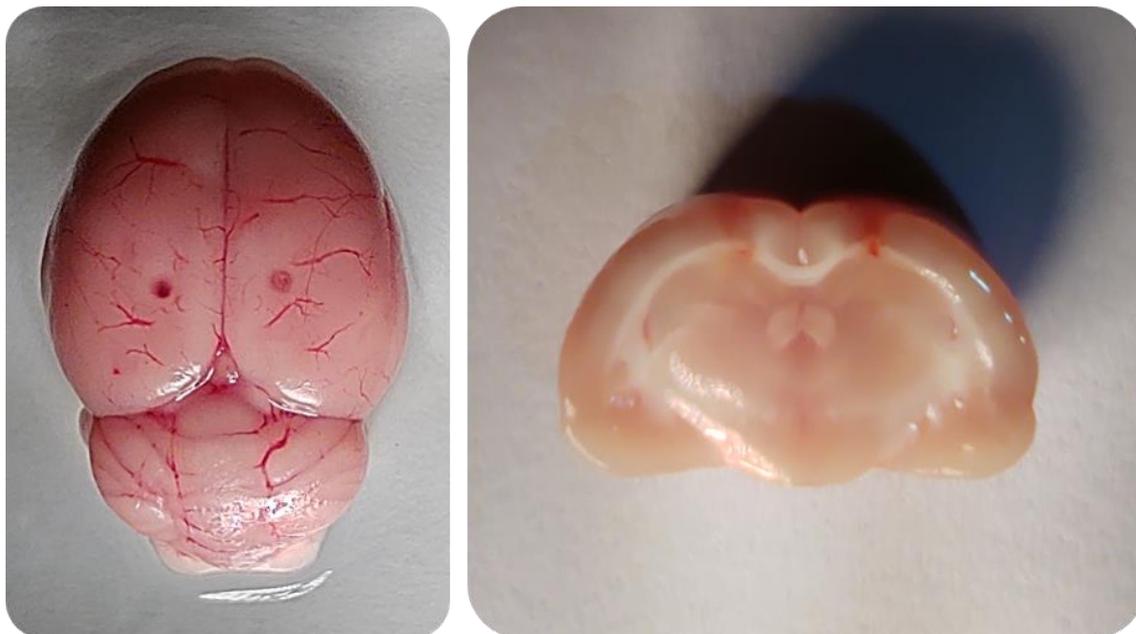


Figura 17 - Imagens representativas dos pontos de alocação das cânulas no encéfalo do animal (Acervo próprio).

Após o procedimento cirúrgico, os animais tiveram um tempo de recuperação total de 2 dias sem passar por quaisquer procedimentos experimentais. Após esse período de recuperação total, os animais passaram pela avaliação do ciclo estral citado durante 5 dias. Além disso, após a recuperação foram realizadas também a troca do mandril e a limpeza das cânulas utilizando um outro mandril, em dias alternados, a começar no 1 dia após a recuperação dos animais e finalizando no dia 1 do experimento.

Durante os experimentos, a administração das drogas foi realizada com o auxílio de uma bomba de infusão. Foram utilizadas seringas de Hamilton de 10 μ l acopladas a um tubo de polietileno PE-10 e uma agulha gengival de 28 gauges (Figura 18). Foi administrado 1 μ L (0,5 μ L por hemisfério) da substância no hipocampo com velocidade de fluxo de 0,5 μ L/min, simultaneamente nos dois hemisférios. Após o término das microinjeções, a agulha foi mantida no local por mais 1 minuto afim de evitar o refluxo dos fármacos. Passando esse tempo, as agulhas foram então retiradas lentamente.

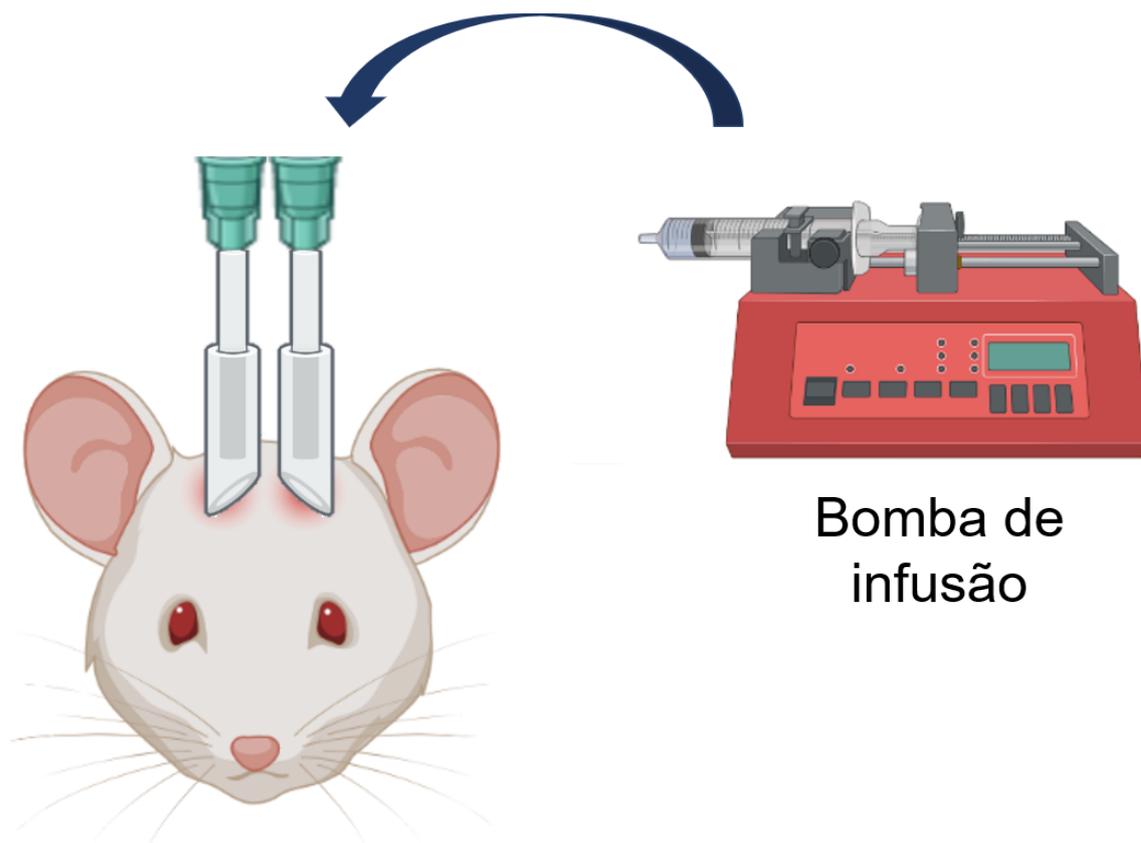


Figura 18 - Representação esquemática da alocação de cânula e administração dos fármacos (Adaptada de Biorender (www.biorender.com))

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi dividido em 4 etapas: I - Efeito da ocitocina sobre formação de memórias aversivas (37 animais); II - Efeito da ocitocina sobre a consolidação de memórias aversivas (25 animais); III - Efeito da ocitocina sobre a evocação de memórias aversivas (24 animais) e IV - Efeito da ocitocina sobre Imunorreatividade para C-Fos (13 animais). O número de animais em cada uma das etapas foi diferente, pois inicialmente tivemos dificuldade em manter os animais com os capacetes fixos durante o período de tempo que necessitamos. Após o refino da técnica e sucesso em manter os animais com os capacetes pelo tempo proposto, passamos a utilizar menos animais por conta de preceitos éticos de uso de animais. Em complemento, o número de animais utilizados no início foi mais alto visto a dificuldade de enquadrar os animais nos grupos ES e DI, então por esses dois fatores o número de animais utilizados variou ao longo do estudo. Além disso, também não foi observado nenhuma diferença entre os grupos ES e DI e esse foi mais um motivo

para a diminuição do uso de animais.

O delineamento experimental nos quatro experimentos é semelhante, mudando apenas o momento da injeção do agonista ou veículo, descrito a seguir.

4.4.1 Experimento I - Efeito da ocitocina sobre aquisição de memórias aversivas

Os animais foram divididos em 2 grupos: grupo controle (CTL) (19 a 23 animais) – animais receberam 1 μL (0,5 μL por hemisfério) de solução veículo e grupo Oxitocina (OXY) (11 a 14 animais) – animais receberam 1 μL (0,5 μL por hemisfério) da solução de ocitocina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Nesse experimento (Figura 11), os animais receberam, no dia do treino, uma injeção bilateral do fármaco 20 minutos antes de serem levados ao aparato da tarefa comportamental. Passado esse tempo, os animais foram levados para o labirinto em cruz modificado para a realização da avaliação comportamental durante 10 minutos e depois retornaram para as suas respectivas gaiolas. Após 24 horas, as ratas foram levadas novamente para o labirinto em cruz modificado, para a realização do teste, onde permaneceram no aparato por 10 minutos e depois retornaram às suas respectivas gaiolas e posteriormente foram eutanasiadas.

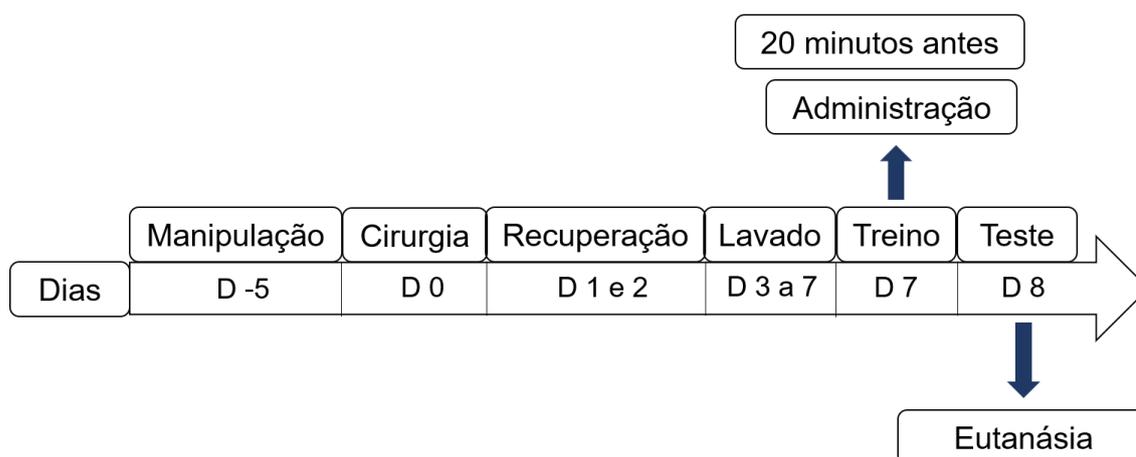


Figura 19 - Delineamento do experimento 1

4.4.2 Experimento II - Efeito da ocitocina sobre a consolidação de memórias aversivas

O experimento II ocorreu de maneira semelhante ao primeiro e com os mesmos grupos experimentais [CTL (9 a 10 animais) e OXY (9 a 15 animais)], alterando apenas o momento de administração da droga. Neste experimento (Figura 12) a administração ocorreu imediatamente após a realização da tarefa no dia do treino. Semelhante ao experimento 1, 24 horas após o treino, as ratas foram levadas novamente para o labirinto em cruz modificado para o teste.

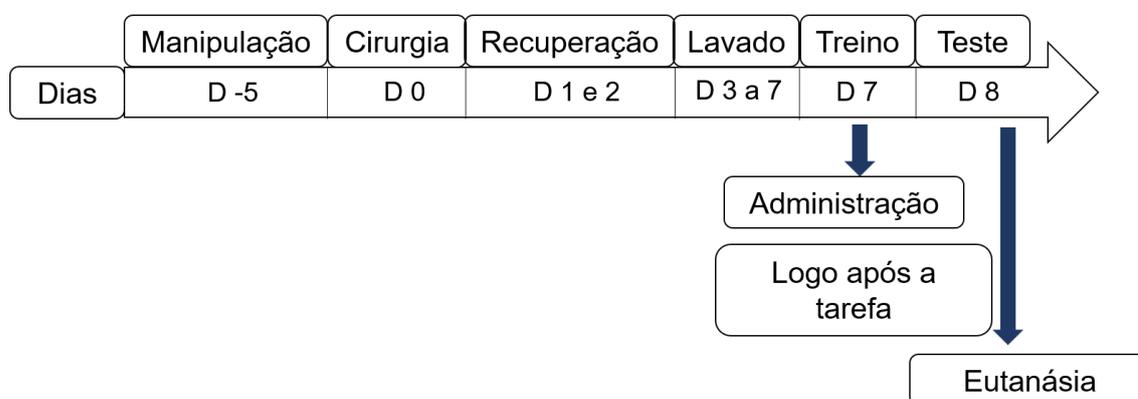


Figura 20 - Delineamento do experimento 2

4.4.3 Experimento III - Efeito da ocitocina sobre a evocação de memórias aversivas.

O terceiro experimento (Figura 13) ocorreu de maneira semelhante [CTL (8 a 12 animais) e OXY (10 a 12 animais)] aos experimentos 1 e 2. A mudança neste é que a administração da droga ocorreu 20 minutos antes da realização da tarefa no dia do teste.

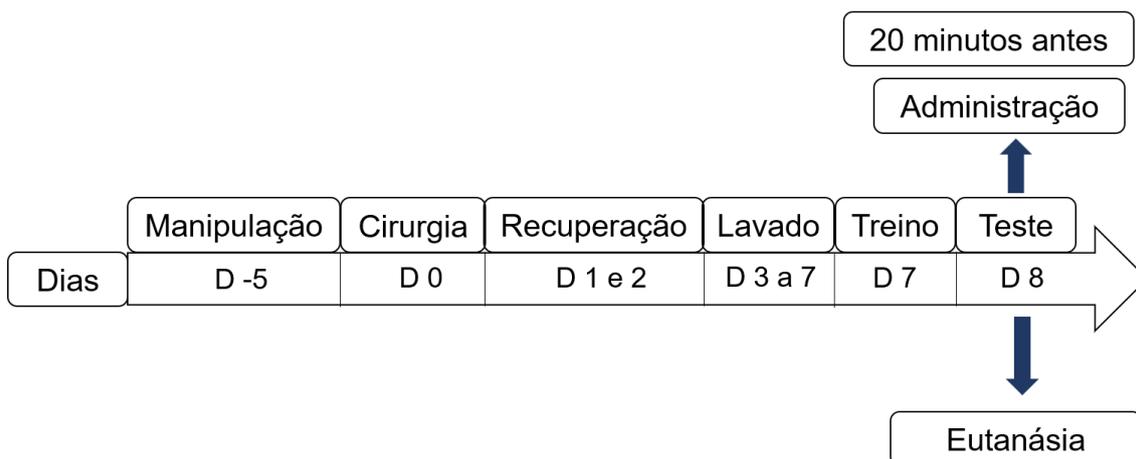


Figura 21 - Delineamento do experimento 3

4.4.4 Experimento IV – Efeito da ocitocina sobre Imunorreatividade para C-Fos.

O último experimento (Figura 14) ocorreu de maneira semelhante ao experimento I [CTL (6 animais) e OXY (7 animais)]. A mudança neste é que uma hora após a entrada do animal no aparato (na sessão de treino), os animais foram anestesiados e perfundidos.

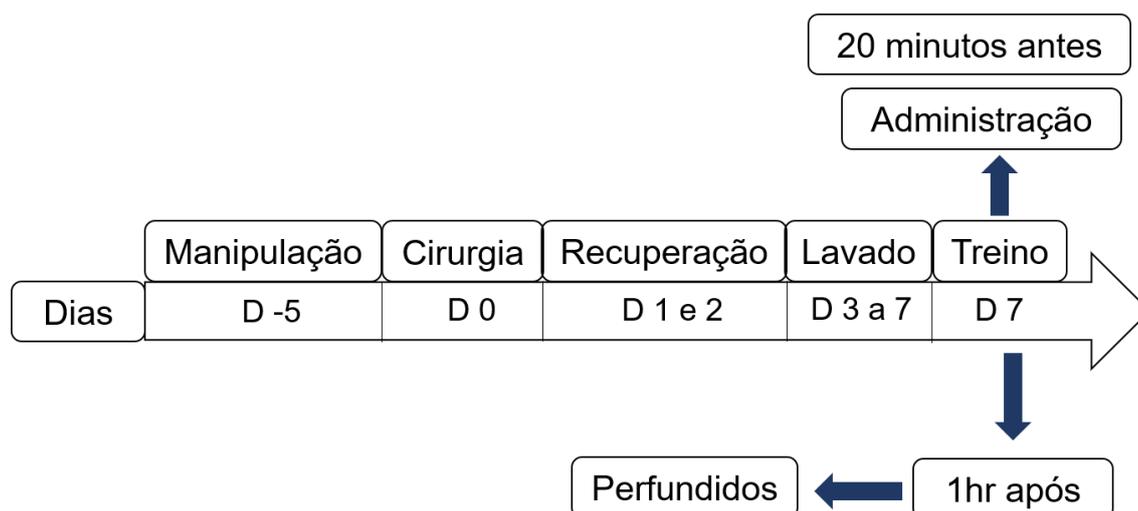


Figura 22 - Delineamento do experimento 4

4.5 TESTE COMPORTAMENTAL

O teste utilizado nos experimentos para a avaliação do aprendizado e

memória foi a tarefa de Labirinto em Cruz Modificado (Figura 15). O aparato (50 cm de altura) é pintado de preto e alocado numa sala sob iluminação de 100 lux e constituído de dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 50 cm), dispostos em um ângulo de 90° (GARCIA; CARDENAS; MORATO, 2005).

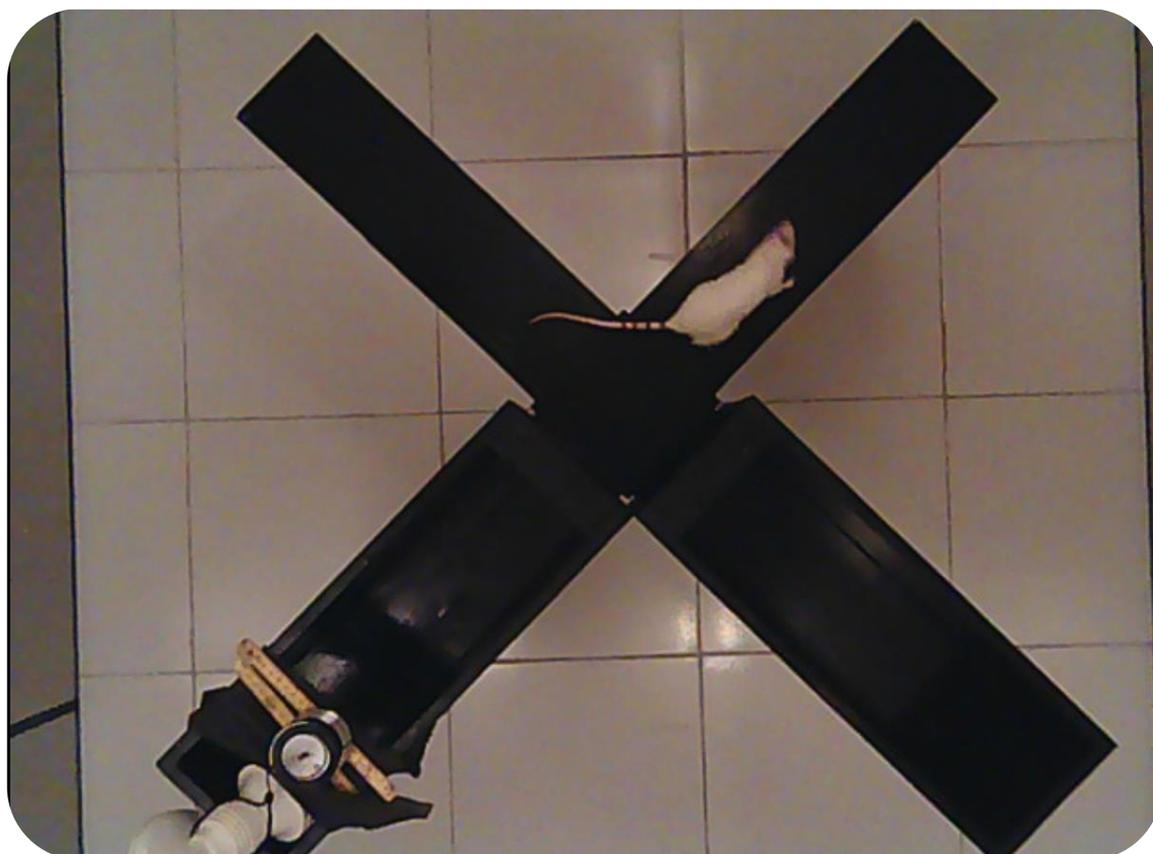


Figura 23 - Labirinto em Cruz elevado modificado (acervo próprio)

Em um dos braços fechados contém uma lâmpada de 100W e uma estrutura para emissão de som de 80 dB (ruído branco) (SOUZA *et al.*, 2022), que são ligados simultaneamente cada vez que o animal adentrar nesse braço (chamado braço aversivo), durante a sessão treino (dia 1). 24 horas após ocorre o teste (dia 2), onde o sistema de luz e som não é acionado quando o animal entra no braço aversivo (Figura 16) (BRANDAÕ *et al.*, 2017; GUIMARÃES MARQUES *et al.*, 2018).

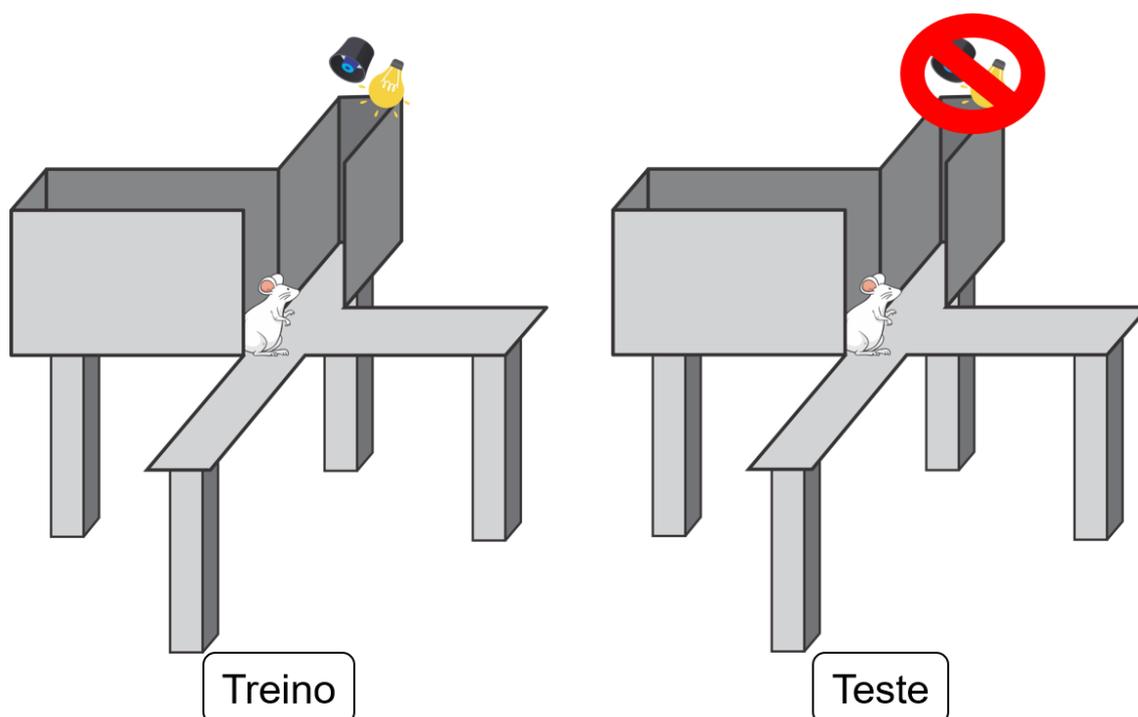


Figura 24. Representação esquemática do labirinto em cruz modificado no treino e teste

As duas fases da tarefa (treino e teste) foram realizadas com a duração de 600 segundos (10 minutos) cada uma. Na etapa de treino avaliamos o comportamento do animal na aquisição da informação que poderá ser convertida em memória. Nesta etapa podemos ainda verificar a curva de aprendizagem dos animais, bem como possíveis modificações no comportamento tipo ansioso. Na etapa de teste avaliamos a evocação (o recordar) de uma informação possivelmente armazenada, que no nosso caso foi o estímulo aversivo vivenciado no dia anterior (fase de treino).

4.5.1 Parâmetros avaliados

No aparato citado realizamos a avaliação de diferentes comportamentos dos animais durante as duas fases da tarefa. Na avaliação da distância total percorrida, foi avaliado quantos metros os animais se locomoveram durante os 600 segundos (tempo total / 10 minutos) de livre exploração dos braços tanto no treino quanto no teste. Outra análise realizada foi a comparação entre os braços seguro e aversivo quanto ao tempo de permanência nos mesmos durante o treino e separadamente a mesma avaliação no teste nos 10 minutos da tarefa. Além disso, avaliamos também

o tempo de permanência apenas no braço aversivo nas fases de treino e teste, no tempo total da tarefa.

Exclusivamente para a análise da permanência no braço aversivo, verificamos também o tempo em blocos de 60 segundos ao longo dos 10 minutos de tarefa (10 blocos de tempo) para verificar a curva de aprendizagem. Com esses dados avaliamos também as equações das retas dos grupos avaliados afim de verificar diferenças no padrão de aprendizado. Além da avaliação dos braços aversivo e seguro, verificamos ainda o tempo de permanência nos braços abertos no treino e teste, também em 600 segundos.

Ainda nas avaliações realizadas com o tempo total da tarefa, avaliamos também o número de entradas no braço aversivo (treino e teste), bem como nos braços abertos (treino e teste). Em complemento, avaliamos a análise de risco dos animais nos braços citados em dois subparâmetros, tempo e tentativas. Na análise por tempo verificamos por quanto tempo os animais expõem apenas a cabeça ao braço avaliado. Já na análise por tentativas, verificamos quantas vezes os animais expõem a cabeça ao braço avaliado.

Dos dados obtidos das análises acima, os valores de comparação entre os braços seguro e aversivo, permanência apenas no braço aversivo (tempo total e blocos de 60 segundos) e permanência nos braços abertos foram ajustados para valores em porcentagem e foram obtidos através da aplicação das seguintes fórmulas: (1) % tempo no braço aversivo ou fechado = tempo no braço aversivo ou fechado / soma dos tempos nos braços fechado e aversivo, e (2) % de tempo no braço aberto = tempo no braço aberto / soma de tempo de todos os braços. As fórmulas adotadas foram retiradas de estudos já publicados por Silva; Frussa-Filho (2000), Munguba *et al.* (2011) e Leão *et al.* (2016).

4.6 PERFUSÃO DOS ANIMAIS E PREPARAÇÃO DOS ENCÉFALOS

Após passarem pela tarefa comportamental (uma hora após), os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal. Com o animal completamente anestesiado e imobilizado foi realizado um acesso a cavidade torácica seccionando-se a pele e

partes moles. Ao se expor a cavidade abdominal foi feita uma incisão no diafragma para exposição do coração. Os animais foram perfundidos de forma intracardíaca com tampão fosfato salina (pH 7,2-7,4) para a lavagem dos vasos, por 5 minutos, e, posteriormente, com paraformaldeído 4% em tampão fosfato (pH 7,4; 100 mM), por 10 minutos, para fixação do tecido. Após a perfusão, os encéfalos foram removidos e mergulhados em paraformaldeído a 4%, a 4°C, por 24 horas. Em seguida, os encéfalos foram guardados por, pelo menos, 48 horas em sacarose à 30% a 4°C.

Os encéfalos foram levados a um criostato à -20 °C para obtenção de secções frontais de 50 µm, as quais foram distribuídas sequencialmente em 4 compartimentos, em um meio líquido contendo solução anticongelante. Cada um desses compartimentos correspondeu a 1 de 4 secções, de maneira que a distância entre uma secção e a seguinte era de aproximadamente 200 µm. Estes cortes foram conservados a 4°C até as reações de imunohistoquímica.

4.7 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA C-fos

A bateria de imuno-histoquímica consistiu nos seguintes passos: 1) lavagem dos tecidos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, quatro vezes, por cinco minutos cada; 2) lavagem dos tecidos em tampão fosfato + água oxigenada (H₂O₂), para bloqueio da peroxidase endógena, por vinte minutos; 3) repetição do procedimento 1; 4) lavagem do material em leite desnatado, para bloqueio de ligações inespecíficas, durante quinze minutos; 5) incubação dos tecidos no anticorpo primário policlonal anti-C-fos (1:500; Santa Cruz Biotechnology, U.S.A) produzidos em coelho diluídos em Triton-X 100 (0,4%) e mantidos overnight (de 12 horas a 18 horas) em agitador automático; 6) repetição do procedimento 1; 7) incubação dos tecidos no anticorpo secundário biotiniliado anti-coelho produzido em cabra (1:750 Sigma Chemical Company) diluído em Triton-X 100 (0,4%) e mantido sob agitação automática por duas horas; 8) repetição do procedimento 1; 9) incubação do material no ABC (Complexo Avidina-Biotina, ABC Elite kit, Vector Labs, Burlingame, EUA concentração de (2:1000), diluído em Triton-X 100 (0,4% + NaCl 0,9%), e mantido no agitador por duas horas; 10) repetição do procedimento 1; 11) revelação do material por meio de lavagens dos tecidos em uma solução de Diaminobenzidina (DAB) + H₂O₂; 12);

repetição do procedimento 1; 13) montagem do tecido em lâminas gelatinizadas. Após a montagem, o material foi reidratado, intensificado em tetróxido de ósmio 0,1% e submetido a uma bateria de desidratação em álcool e xilol. As lâminas foram cobertas com meio de montagem e fixação de uma lamínula. Todos os procedimentos acerca da realização da perfusão e da imunohistoquímica, foram feitos seguindo protocolos realizados em trabalhos anteriores como: Melo *et al.* (2022), Bispo *et al.* (2019) e Lins *et al.* (2018).

4.8 AQUISIÇÃO DE IMAGENS E CONTAGEM DE CÉLULAS

As lâminas foram fotografadas em um microscópio óptico (Nikon Eclipse Ci-S, Nikon Corporation inc., Japan), com câmera fotográfica digital acoplada (Ds-fi1c, Nikon Corporation inc., Japan) e programa de computador específico para essa finalidade (Ds-U3, Labconco Corporation inc., EUA).

Para cada animal analisado, foram feitas imagens dos cortes, em aumento de 10x, nas quais foi possível ver em detalhes a presença ou ausência de células marcadas nos tecidos. A contagem de células foi realizada em 4 secções de cada animal e o número de células para cada um deles corresponde à média entre as 4 secções analisadas.

As áreas analisadas foram os córtices cingulado anterior, pré-límbico e infralímbico, hipocampo dorsal (CA1, CA3 e giro denteado) e amígdala. Todas as células marcadas na área de interesse foram contadas usando o software Image J (versão 1.46i, NIH) e a delimitação da área foi realizada com base no atlas de Paxinos e Watson (2014). Todas as contagens foram realizadas de forma “cega”, em que o experimentador não soube a que grupo pertencia cada imagem a ser contada. Os valores para cada animal foram normalizados pela média dos valores obtidos nos animais pertencentes ao grupo controle de cada etapa.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e após verificação da normalidade dos mesmos, em cada avaliação os dados foram submetidos a testes de identificação de outliers e quando identificados os mesmos foram retirados das análises. Após estes passos, foram realizados testes de ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Sidak. Além disso, para os dados de permanência no braço aversivo em blocos de 60s, realizamos também análise das equações da reta dos grupos experimentais através da regressão linear. Além disso, para os dados de imunohistoquímica realizamos um teste t não-pareado para cada região analisada. Os dados apresentados são expressos em média \pm erro padrão da média (\pm E.P.M.), com nível de significância de $p < 0,05$ para diferenças significativas. As análises foram realizadas com a utilização do software *Graphpad Prism 8.0*.

5 RESULTADOS

Antes de iniciar a descrição dos resultados, com base nos dados obtidos ao longo dos experimentos 1, 2 e 3, verificamos que não houve diferença estatística entre as fases do ciclo estral e grupos que relatamos no item “4.3 Monitoramento do ciclo estral”, dessa forma verificamos que o efeito da administração da ocitocina no hipocampo de ratas, sobre os processos de memória aversiva, foi o mesmo independente se os animais eram do grupo ES ou DI dentro do mesmo tratamento (CTL ou OXY). A tabela 1 mostra um resumo dos valores obtidos pelos animais nos 4 grupos (CTL-ES, CTL-DI, OXY-ES e OXY-DI) em todas as análises comportamentais que realizamos no presente estudo para o experimento 1 e o mesmo foi observado para os experimentos 2 e 3 (dados não mostrados). Depois desta avaliação e a verificação de não haver diferenças nos parâmetros que avaliamos, optamos por unificar os grupos antes divididos por fase do ciclo, onde CTL-ES e CTL-DI foram unificados em CTL enquanto que OXY-ES e OXY-DI foram unificados em OXY. Optamos por essa fusão afim de projetar uma melhor visualização dos resultados obtidos.

Outra observação que destacamos é que algumas das análises que realizamos mostram, por exemplo, efeito da **interação** entre tratamento e tempo [fase da tarefa (treino ou teste)] ou entre tratamento e permanência no braço (aversivo ou seguro). Esse efeito da interação reflete em comparações que não trazem informações relevantes aos objetivos de nosso estudo, a citar: $p < 0,05$ (valor ilustrativo com finalidade de ilustrar nossa explicação) quando comparado CTL no treino x OXY no teste ou ainda CTL no braço aversivo x OXY no braço seguro. Essas comparações pouco informativas não foram expostas no presente estudo.

Tabela 1 - Efeito do ciclo estral nos animais do experimento 1 sobre todas as análises comportamentais avaliadas. Não foi verificado efeito do ciclo estral sobre os parâmetros avaliados. Os Valores são expressos como média \pm E.P.M.

Avaliação dos grupos ciclo estral						
Avaliações	Grupos		Valor de p	OXY-ES	OXY-DI	Valor de p
	CTL-ES	CTL-DI				
Tempo B. Seguro treino (%)	86,6 \pm 4,0	87,3 \pm 2,4	p=0,9	77,0 \pm 3,5	70,6 \pm 12,6	p=0,4
Tempo B. Aversivo treino (%)	13,3 \pm 4,0	12,6 \pm 2,4	p=0,9	22,9 \pm 3,5	29,3 \pm 12,6	p=0,4
Tempo B. Seguro teste (%)	41,8 \pm 9,8	49,7 \pm 9,8	p=0,9	43,7 \pm 14,0	31,9 \pm 15,1	p=0,9
Tempo B. Aversivo teste (%)	58,2 \pm 9,8	50,2 \pm 9,8	p=0,9	56,3 \pm 14,0	68,0 \pm 15,1	p=0,9
Entradas B. Aversivo treino	6,4 \pm 0,9	6,5 \pm 1,0	p>0,9	8,8 \pm 1,3	6 \pm 2,1	p=0,7
Entradas B. Aversivo teste	8,1 \pm 1,3	6,4 \pm 1,4	p=0,9	5,8 \pm 1,4	5 \pm 1,5	p=0,9
Entradas B. Abertos treino	3,4 \pm 1,3	2,9 \pm 0,5	p=0,9	3,2 \pm 0,8	2,1 \pm 1,0	p=0,9
Entradas B. Abertos teste	3,1 \pm 1,0	2,4 \pm 0,5	p=0,9	2,1 \pm 0,6	0,3 \pm 0,3	p=0,7
Análise de risco B. Aversivo (tempo) treino (segundos)	83,7 \pm 2,8	72,8 \pm 5,4	p>0,9	131,0 \pm 19,4	173,1 \pm 70,7	p=0,9
Análise de risco B. Aversivo (tempo) teste (segundos)	270,5 \pm 0,8	232,6 \pm 58,0	p=0,9	210,3 \pm 59,0	372,5 \pm 88,3	p=0,2
Análise de risco B. Aversivo (entradas) treino	11,1 \pm 1,4	9,1 \pm 2,0	p=0,9	13,6 \pm 2,3	9,5 \pm 2,4	p=0,7
Análise de risco B. Aversivo (entradas) teste	9,6 \pm 1,8	9,6 \pm 2,0	p>0,9	8 \pm 1,9	6,6 \pm 2,4	p=0,9
Análise de risco B. Aberto (tempo) treino (segundos)	50,6 \pm 19,3	82,7 \pm 35,7	p=0,8	59,5 \pm 12,8	44,6 \pm 15,1	p=0,9
Análise de risco B. Aberto (tempo) teste (segundos)	45,8 \pm 14,7	41,1 \pm 11,4	p>0,9	45,3 \pm 11,7	17,6 \pm 11,0	p=0,9
Análise de risco B. Aberto (entradas) treino	10,1 \pm 1,4	9,3 \pm 1,4	p>0,9	13,1 \pm 2,9	10,3 \pm 3,3	p=0,9
Análise de risco B. Aberto (entradas) teste	8,6 \pm 1,8	8,2 \pm 1,9	p>0,9	9,1 \pm 1,9	6 \pm 2,8	p=0,9

5.1 ATIVIDADE MOTORA

A atividade motora dos animais foi avaliada através da distância total percorrida (em metros). A ANOVA de 2 vias revelou que não houve alterações entre os grupos

analisados, nos três experimentos, quanto ao tratamento (CTL e OXY) {Exp 1: [F(1, 35)=0,0007, p=0,9]; Exp 2: [F(1,23)=0,008, p=0,9] e Exp 3: [F(1,22)=3,6, p=0,06]}, quanto a fase da tarefa (treino e teste) {Exp 1: [F(1,28)=6,5, p=0,07; Exp 2: [F(1,23)=2,9, p=0,1]; Exp 3: [F(1,22)=1,6, p=0,2]} e interação tratamento x fase da tarefa {Exp 1: [F(1,28)=0,1, p=0,6]; Exp 2: [F(1,23)=0,7, p=0,4]; Exp 3: [F(1,22)=0,8, p=0,3]}, como apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Efeito da ocitocina sobre a distância total percorrida, em metros, durante treino e teste na tarefa de labirinto em cruz modificado. Não houve efeito do tratamento sobre o parâmetro avaliado. Os Valores são expressos como média \pm E.P.M.

Distância total percorrida (metro)		
Grupos	CTL	OXY
EXP 1		
TREINO	18,32 \pm 1,3	18,7 \pm 2,3
TESTE	16,0 \pm 1,7	16,5 \pm 2,1
EXP 2		
TREINO	11,7 \pm 2,0	13,1 \pm 0,9
TESTE	10,5 \pm 1,1	9,4 \pm 1,6
EXP 3		
TREINO	22,5 \pm 1,4	19,4 \pm 0,9
TESTE	22,0 \pm 2,6	16,4 \pm 1,9

5.2 EXPERIMENTO 1 – EFEITO DA OCITOCINA NA AQUISIÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS

Durante a etapa de treino, a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito da porcentagem de **permanência nos braços (seguro ou aversivo)** [F(1,70)=287,3], p<0,0001] e interação da permanência nos braços (seguro ou aversivo) x tratamento (CTL e OXY) [F(1,70)=12,4, p=0,0007], mas não houve efeito do tratamento [F(1,70)=0,000, p>0,9]. O pós-teste de Sidak mostrou que em ambos os grupos houve

diminuição na porcentagem de permanência no braço aversivo se comparado ao seguro ($p < 0,0001$ para os 2 grupos) (Figura 25A).

Na etapa de teste, a ANOVA de duas vias revelou que houve diferença na permanência nos braços (seguro ou aversivo) [$F(1,63)=4,3$, $p=0,04$] e na interação da permanência nos braços (seguro ou aversivo) x tratamento [$F(1,63)=4,8$, $p=0,03$], mas não para o tratamento [$F(1,63)=0,01$, $p=0,9$]. O pós-teste de Sidak mostrou que apenas o grupo CTL apresentou diminuição na porcentagem de permanência no braço aversivo se comparado ao seguro ($p=0,002$) (Figura 25B).

Analisando a **porcentagem de tempo apenas no braço aversivo**, durante as fases de treino e teste, a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do tratamento [$F(1,63)=5,8$, $p=0,01$] e da porcentagem de permanência no braço no treino e teste [$F(1,63)=13,2$, $p=0,0006$], mas não houve diferença na interação tratamento x porcentagem de permanência no braço [$F(1,63)=0,2$, $p=0,6$]. O pós-teste de Sidak mostrou que o grupo CTL apresentou aumento na porcentagem de permanência no braço no teste quando comparado ao treino ($p=0,002$). O pós-teste revelou ainda que na fase de treino o grupo OXY apresentou aumento na porcentagem de permanência do braço se comparado a CTL ($p=0,04$) (Figura 25C). Para a análise apenas da % de tempo nos braços seguros durante as fases de treino e teste, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada.

Porcentagem de tempo nos braços seguro e aversivo

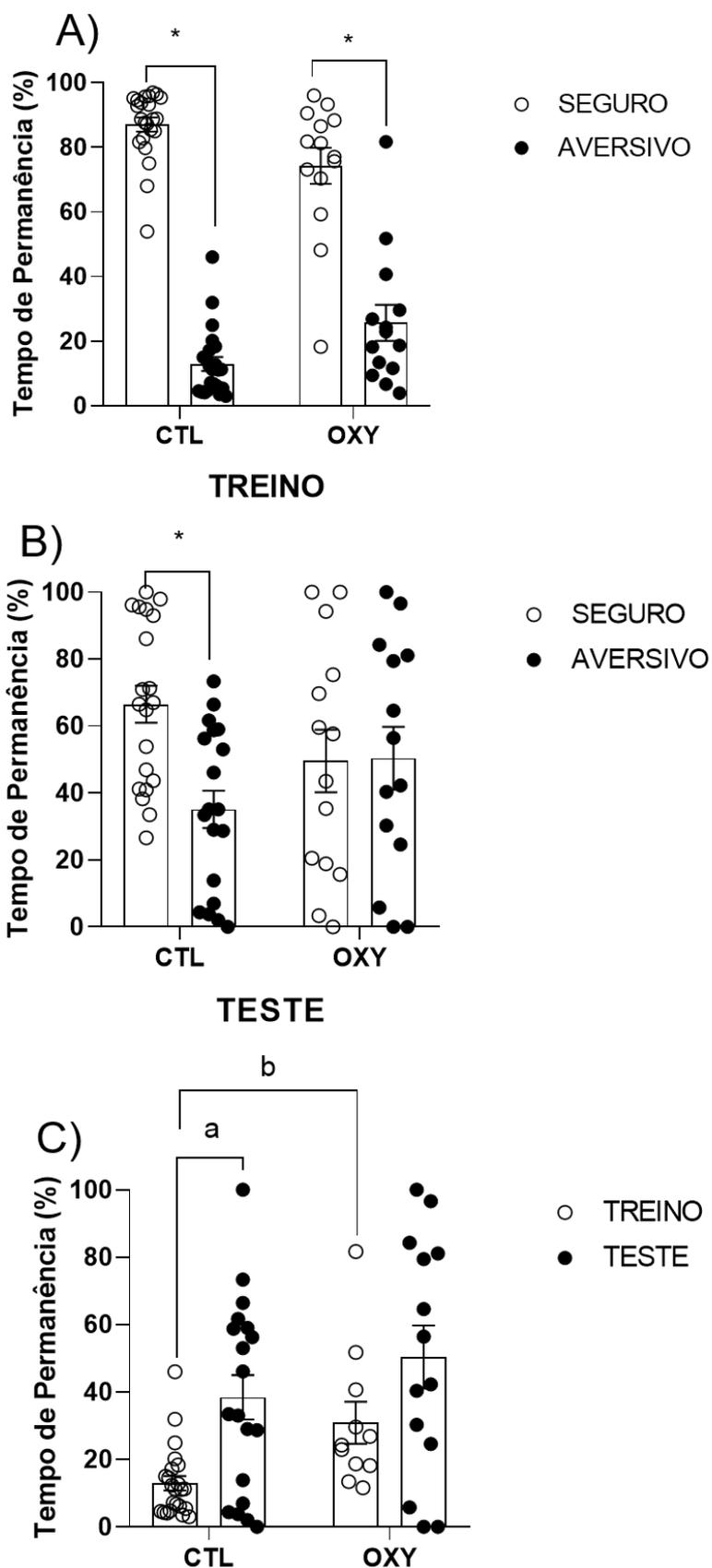


Figura 25 - Experimento I - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) na comparação dos braços seguro e aversivo durante treino (A) e teste (B) e no braço aversivo durante treino e teste (C) na tarefa de labirinto em cruz modificado. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. $p^* < 0,05$ quando comparado braço aversivo com braço seguro, $p(a) < 0,05$ quando comparado com treino, $p(b) < 0,05$ quando comparado OXY com CTL (Anova de duas vias seguida do pós-teste de Sidak).

Quando analisamos, **minuto a minuto**, a **porcentagem de tempo no braço aversivo** durante a fase de treino, a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do tratamento $F(1,35)=6,2$, $p=0,01$] e da comparação entre os blocos de tempo [$F(9, 315)=21,0$, $p<0,0001$], mas não houve diferença na interação tratamento x comparação minuto a minuto [$F(9,315)=0,7$, $p=0,6$]. O pós-teste de Sidak revelou que nos minutos 3 e 10 o grupo OXY apresentou maior permanência no braço se comparado a CTL ($p=0,04$ e $p=0,04$, respectivamente). O pós-teste revelou ainda que do minuto três ao dez houve gradativa diminuição da permanência no braço aversivo para o grupo CTL quando comparados ao primeiro ($p_3=0,03$ $p_4=0,01$; $p_5=0,007$; $p_6=0,0007$; $p_7<0,0001$; $p_8<0,0001$; $p_9<0,0001$; $p_{10}<0,0001$). De maneira semelhante foi observado para o grupo OXY, contudo, essa diminuição foi observada a partir do bloco cinco ($p_5=0,006$; $p_6=0,0002$; $p_7<0,0001$; $p_8<0,0001$; $p_9<0,0001$; $p_{10}<0,0001$) (Figura 26A).

Na avaliação da fase de teste a ANOVA de duas vias não mostrou efeito do tratamento [$F(1,35)=0,08$ $p=0,7$], comparação entre os blocos de tempo [$F(9,315)=1,1$, $p=0,3$] ou na interação tratamento x comparação entre os blocos de tempo [$F(9,315)=0,8$, $p=0,5$] (Figura 26B).

Na avaliação da equação da reta usando a regressão linear durante o treino (Figura 26C), foi verificado para o grupo CTL a equação $Y = -4,2 \cdot X + 39,0$; $R^2 0,9$; ($F=83,6$. $DFn=1$, $DFd=8$, $p < 0,0001$) e para o grupo OXY $Y = -5,8 \cdot X + 60,2$; $R^2 0,9$; ($F=155,8$. $DFn=1$, $DFd=8$, $p < 0,0001$). A análise mostrou ainda que as retas diferem entre si ($F=5,4$. $DFn=1$, $DFd=16$, $p=0,03$). Diante disso verificamos que o grupo OXY apresentou maior coeficiente de determinação (R^2), indicando aprendizado mais lento para este grupo.

Porcentagem de tempo no braço aversivo (60s)

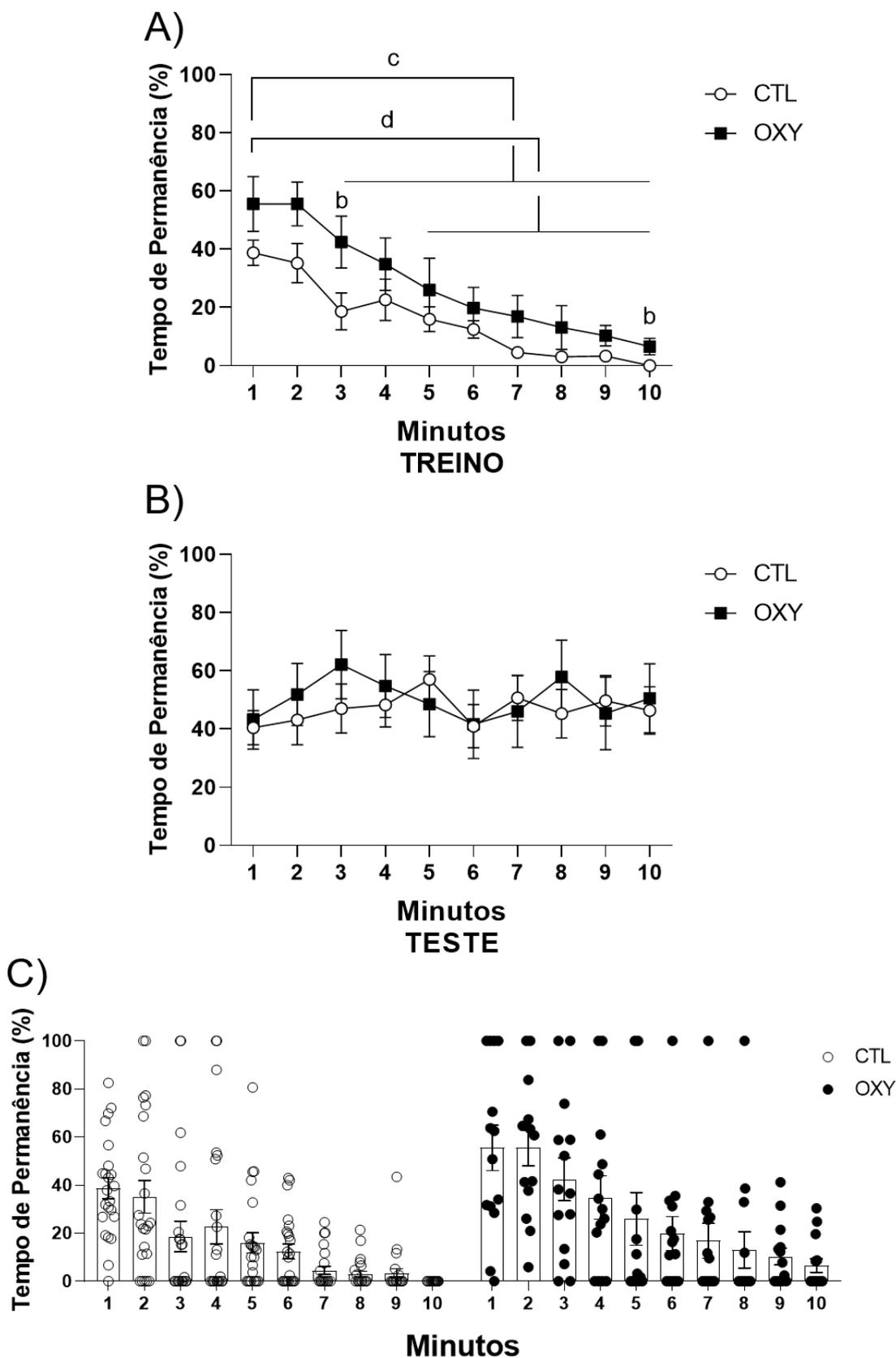


Figura 26 - Experimento I - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) no braço aversivo durante treino (A) e teste (B) e regressão linear no treino (C) na tarefa de labirinto em cruz modificado em blocos de 60 segundos na tarefa de labirinto em cruz modificado. Os Valores são expressos como média \pm E.P.M. $p(b) < 0,05$ quando comparado OXY com CTL, $p(c) < 0,05$ quando comparado com bloco de tempo em questão ao bloco 1 a partir do bloco 3 para o grupo CTL e $p(d) < 0,05$ quando comparado com bloco de tempo ao bloco 1 a partir do bloco 4 para o grupo OXY (Anova de duas vias seguida do pós-teste de Sidak para A e B e Regressão linear para C).

Em relação ao **número de entradas no braço aversivo**, a ANOVA de duas vias revelou que não houve diferença no tratamento [$F(1,35)=0,05$, $p=0,8$], no número de entradas no braço no treino e teste [$F(1,35)=0,7$, $p=0,3$] e da interação tratamento x número de entradas no braço [$F(1,35)=2,9$, $p=0,09$] (Figura 27A).

Na avaliação do **número de entradas nos braços abertos**, a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito quanto ao número de entradas no braço no treino e teste [$F(1,30)=6,5$, $p=0,01$], mas não para o tratamento [$F(1,34)=1,5$, $p=0,2$] e interação tratamento x número de entradas no braço [$F(1,30)=3,6$, $p=0,06$] (Figura 27B). O pós-teste de Sidak mostrou que o grupo OXY apresentou diminuição do parâmetro no teste se comparado a ele mesmo no treino ($p=0,01$).

Entradas nos braços aversivo e abertos

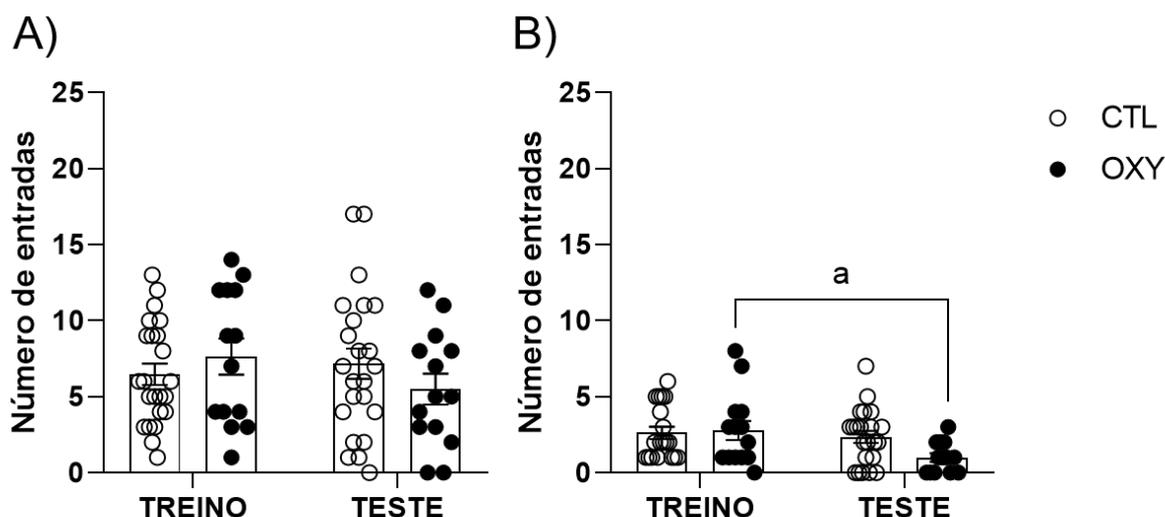


Figura 27 - Experimento I - Efeito da ocitocina sobre número de entradas no braço aversivo (A) e nos braços abertos (B) na tarefa de labirinto em cruz modificado. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. $p(a) < 0,05$ quando comparado com treino (Anova de duas vias seguida do pós-teste de Sidak).

Quando analisada a **porcentagem de tempo nos braços abertos**, a ANOVA de duas vias revelou que não houve efeito do tratamento [$F(1,35)=0,04$, $p=0,8$], da fase da tarefa (treino/teste) [$F(1,35)=3,6$, $p=0,06$] e interação tratamento x fase da tarefa [$F(1,35)=2,0$, $p=0,1$] sobre o parâmetro analisado (Figura 28).

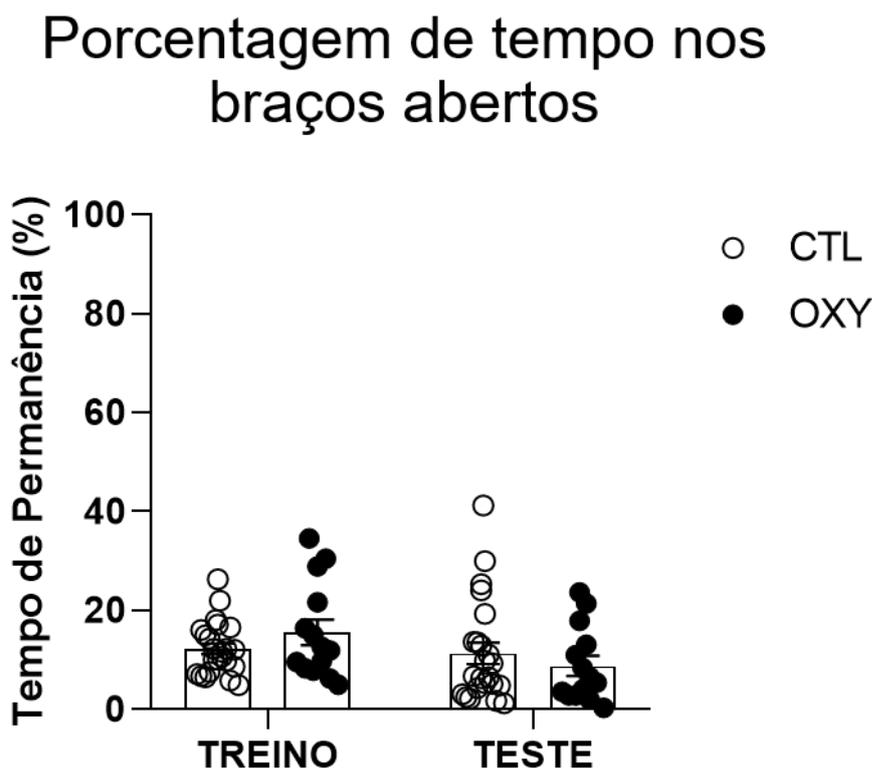


Figura 28 - Experimento I - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) nos braços abertos durante treino e teste na tarefa de labirinto em cruz modificado. Os Valores são expressos como média \pm E.P.M. Não houve efeito do tratamento sobre o parâmetro avaliado.

Na avaliação da **análise de risco** realizada pelos animais no **braço aversivo, por tempo** (Figura 29A), a ANOVA de duas vias revelou efeito da exploração do braço no treino e teste [$F(1,68)=23,1$, $p<0,0001$], mas não do tratamento [$F(1,68)=1,5$, $p=0,2$] e interação tratamento x exploração do braço [$F(1,68)=0,1$, $p=0,7$]. O pós-teste de Sidak mostrou que ambos os grupos apresentaram aumento no parâmetro no teste se comparados a seus respectivos no treino (CTL, $p=0,0001$ e OXY $p=0,01$). Quando a análise de risco foi realizada através do **número de tentativas** (Figura 29B), a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do número de tentativas de entradas no braço no treino e teste [$F(1,35)=4,5$, $p=0,04$], mas não do tratamento [$F(1,$

35)=0,01, $p=0,9$] e interação tratamento x número de tentativas de entradas no braço no treino e teste [$F(1,35) = 3,3$, $p=0,07$]. O pós-teste de Sidak mostrou que o grupo OXY apresentou diminuição do parâmetro no teste se comparado a ele mesmo no treino ($p=0,03$).

Já para as análises nos **braços abertos**, na avaliação da **análise de risco por tempo** (Figura 29C), a ANOVA de duas vias revelou que não houve efeito do tratamento [$F(1,35)=0,0008$, $p=0,9$], na exploração do braço no treino e teste [$F(1,33)=2,5$, $p=0,1$] e também na interação tratamento x exploração do braço [$F(1,33)=2,7$, $p=0,1$]. Na avaliação da análise de risco **por tentativas** (Figura 29D), a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito no número de tentativas de entradas no braço no treino e teste [$F(1,35)=6,7$, $p=0,01$], mas não para o tratamento [$F(1,35)=0,1$, $p=0,6$] e interação tratamento x número de tentativas de entradas no braço [$F(1,35)=1,8$, $p=0,1$]. O pós-teste de Sidak mostrou que o grupo OXY apresentou diminuição do parâmetro no teste se comparado a ele mesmo no treino ($p=0,03$).

Análise de risco dos braços aversivo e abertos

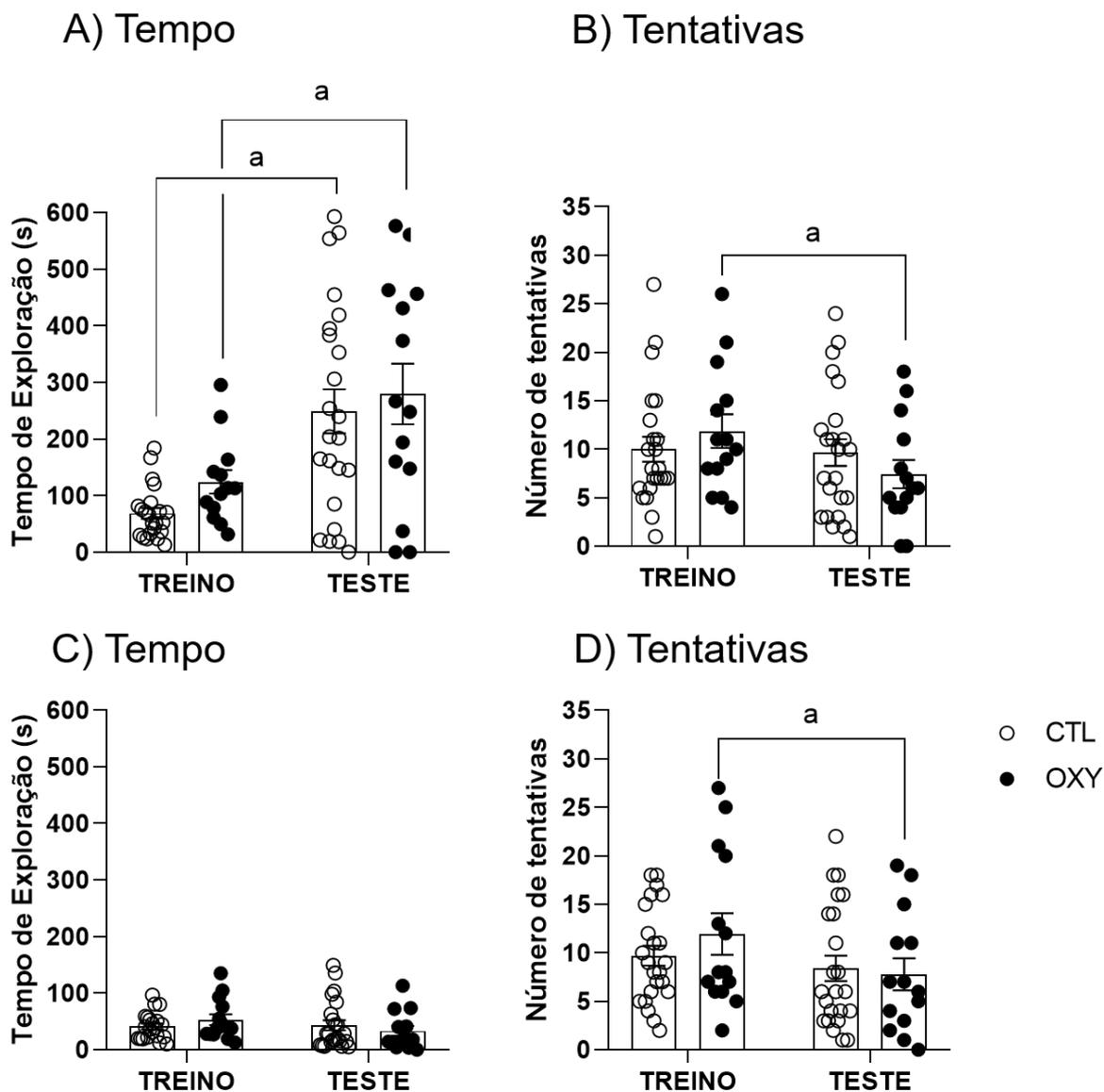


Figura 29 - Experimento I - Efeito da ocitocina sobre a análise de risco nos braços aversivo e abertos na tarefa de labirinto em cruz modificado. Análise do braço aversivo por tempo de exploração (A) e por tentativas realizadas (B) e análise dos braços abertos por tempo de exploração (C) e por tentativas realizadas (D). Os valores são expressos como média \pm E.P.M. $p(a) < 0,05$ quando comparado com treino (Anova de duas vias seguida do pós-teste de Sidak).

5.3 EXPERIMENTO 2 – EFEITO DA OCITOCINA NA CONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS

Durante a etapa de treino, a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito da porcentagem de **permanência nos braços (seguro ou aversivo)** [$F(1,42)=1005$, $p<0,0001$] e interação permanência nos braços (seguro ou aversivo) x tratamento [$F(1,42)=4,5$, $p=0,03$] mas não houve efeito do tratamento [$F(1, 42)=9,0$, $p>0,9$] para a % de tempo de permanência nos braços seguro e aversivo. O pós-teste de Sidak mostrou que em ambos os grupos houve diminuição na porcentagem de permanência no braço aversivo se comparado ao seguro ($p<0,0001$ para ambos) (Figura 30A).

Na etapa de teste a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito da porcentagem de permanência nos braços (seguro ou aversivo) [$F(1,42)=7,6$, $p=0,0085$], mas não houve efeito do tratamento [$F(1,42)=0,000$, $p>0,9$] ou interação permanência nos braços (seguro ou aversivo) x tratamento [$F(1,42)=3,8$, $p=0,05$]. O pós-teste de Sidak mostrou que no grupo CTL houve diminuição na porcentagem de permanência no braço aversivo se comparado ao seguro ($p=0,008$) (Figura 30B).

Analisando a **porcentagem de tempo apenas no braço aversivo**, durante as fases de treino e teste, a ANOVA de duas vias revelou que houve diferença quanto a porcentagem de permanência no braço no treino e teste [$F(1,43)=15,4$, $p=0,0003$], mas não houve diferença do tratamento [$F(1,43)=1,2$, $p=0,2$] ou interação tratamento x porcentagem de permanência no braço [$F(1,43)=0,1$, $p=0,6$]. O pós-teste de Sidak mostrou que ambos os grupos apresentaram aumento na porcentagem de permanência no braço no teste quando comparado ao treino (CTL, $p=0,04$ e OXY $p=0,003$) (Figura 30C). Para a análise apenas da % de tempo nos braços seguros durante as fases de treino e teste, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada.

Porcentagem de tempo nos braços seguro e aversivo

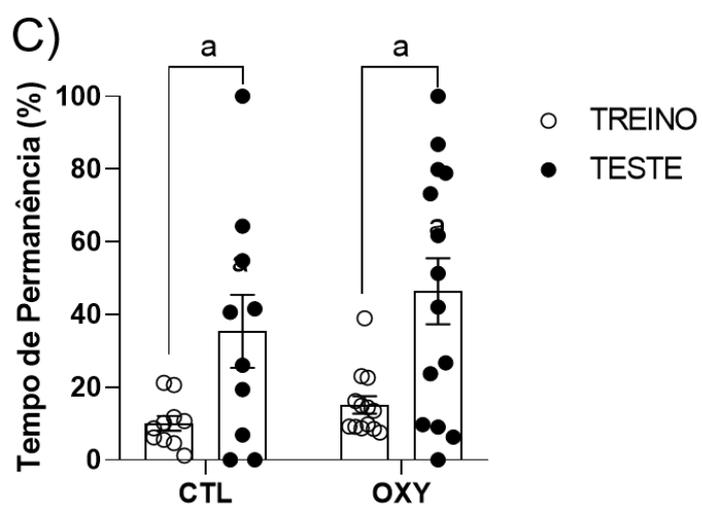
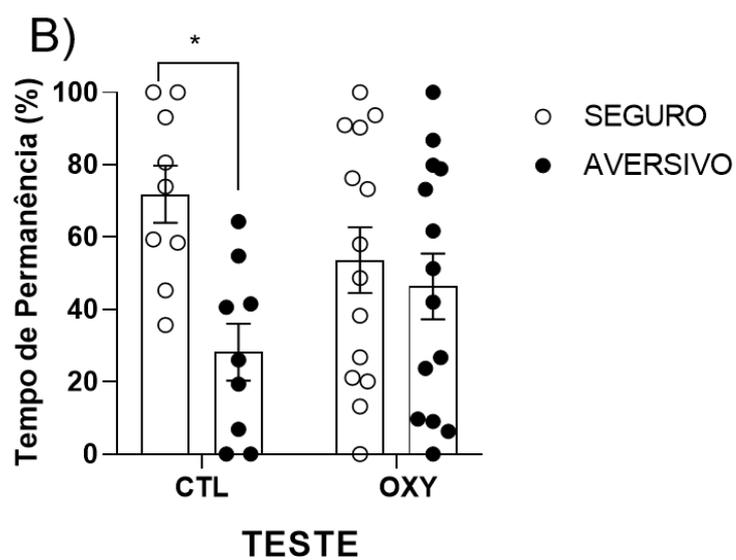
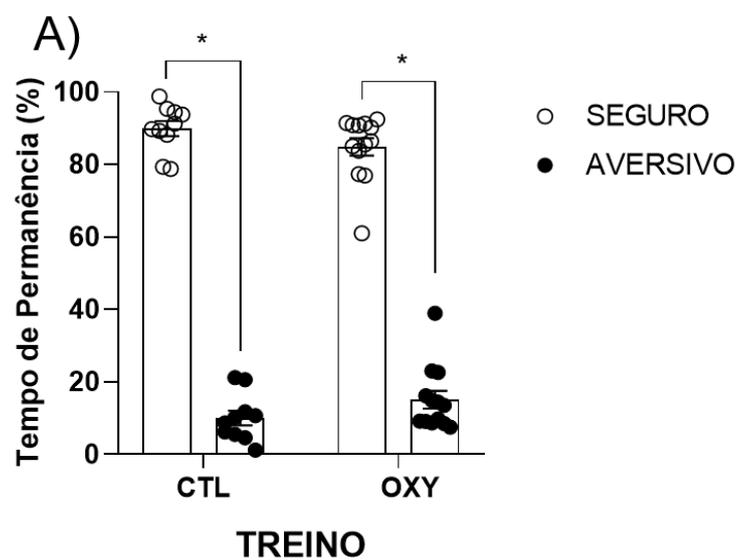


Figura 30 - Experimento II - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) na comparação dos braços seguro e aversivo durante treino (A) e teste (B) e no braço aversivo durante treino e teste (C) na tarefa de labirinto em cruz modificado. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. $p(\cdot) < 0,05$ quando comparado braço aversivo com braço seguro, $p(a) < 0,05$ quando comparado com treino (Anova de duas vias seguida do pós-teste de Sidak).

Quando analisamos, **minuto a minuto, a porcentagem de tempo nos braços aversivos** durante a fase de treino, a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito da comparação entre os blocos de tempo [$F(9,189)=20,2$, $p < 0,0001$], mas não houve diferença do tratamento [$F(1,21)=3,2$, $p=0,08$] ou interação tratamento x da comparação minuto a minuto [$F(9,189)=0,9$, $p=0,4$]. O pós-teste de Sidak revelou que do minuto 3 ao 10 houve gradativa diminuição da permanência no braço aversivo tanto para o grupo CTL quanto para o grupo OXY quando comparados ao minuto 1 {[**CTL**; ($p_3=0,001$; $p_4=0,01$; $p_5=0,01$; $p_6=0,0006$; $p_7=0,0001$; $p_8 < 0,0001$; $p_9=0,0008$; $p_{10}=0,0005$)], [**OXY**; ($p_3 < 0,0001$; $p_4 < 0,0001$; $p_5 < 0,0001$; $p_6 < 0,0001$; $p_7 < 0,0001$; $p_8 < 0,0001$; $p_9 < 0,0001$; $p_{10} < 0,0001$)]} (Figura 31A).

Na avaliação da fase de teste a ANOVA de duas vias não mostrou efeito do tratamento [$F(1,22)=0,7925$, $p=0,3830$], da comparação entre os blocos de tempo [$F(9,198)=1,214$, $p=0,2882$] ou na interação tratamento x da comparação entre os blocos de tempo [$F(9, 198)=1,222$, $p=0,2834$] (Figura 31B).

Na avaliação da equação da reta usando a regressão linear durante o treino (Figura 31C), foi verificado para o grupo CTL a equação $Y = -4,1 \cdot X + 36,7$; $R^2 0,6$; ($F=13,0$. $DFn=1$, $DFd=8$, $p=0,006$) e para o grupo OXY $Y = -5,6 \cdot X + 58,3$; $R^2 0,6$; ($F=12,5$. $DFn=1$, $DFd=8$, $p=0,007$). A análise mostrou ainda que as retas não diferem entre si ($F=0,6$. $DFn=1$, $DFd=16$, $p=0,4$).

Porcentagem de tempo no braço aversivo (60s)

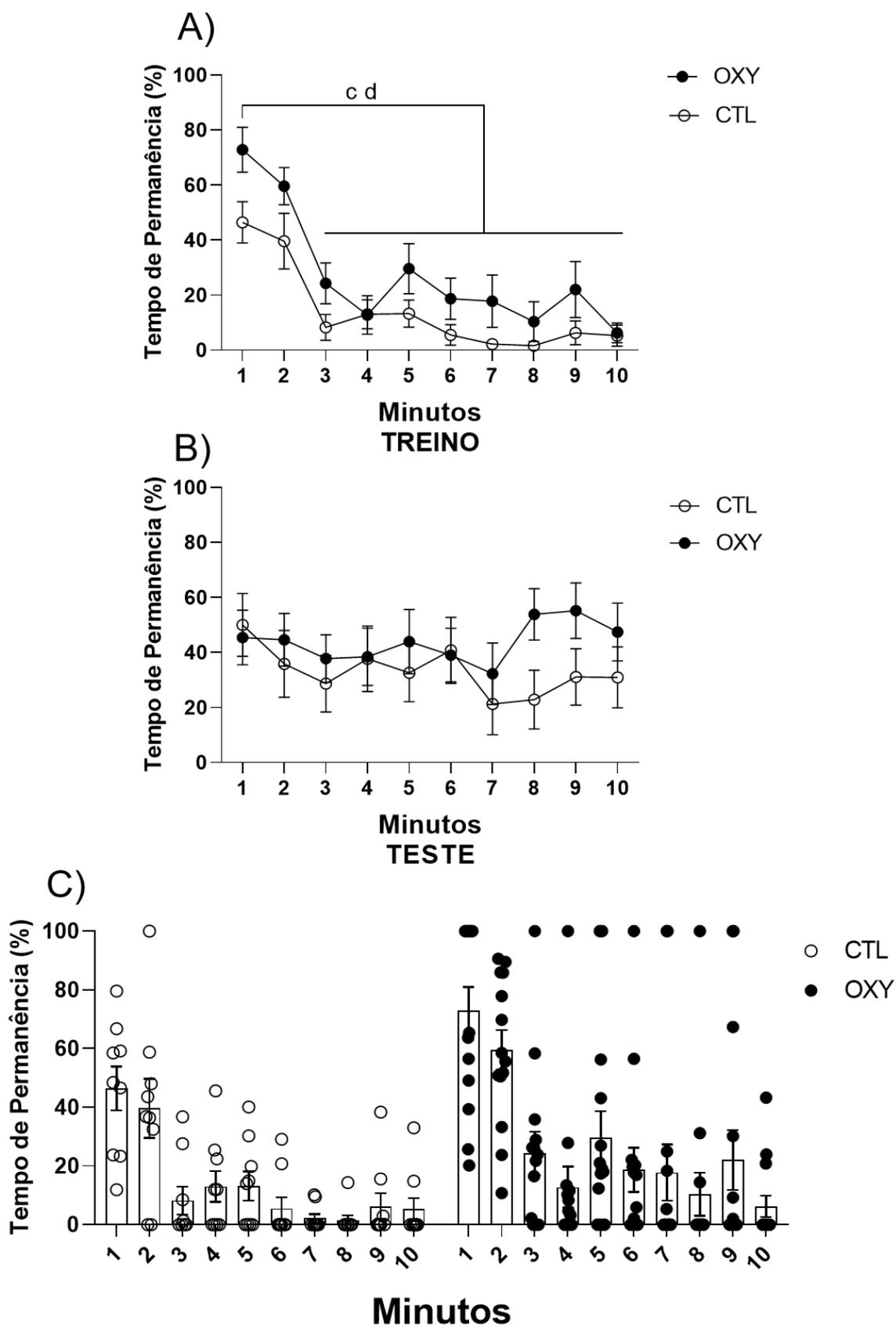


Figura 31 - Experimento II - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) no braço aversivo durante treino (A) e teste (B) e regressão linear no treino (C) na tarefa de labirinto em cruz modificado em blocos de 60 segundos. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. $p(c) < 0,05$ quando comparado com bloco de tempo em questão ao bloco 1 a partir do bloco 3 para o grupo CTL e $p(d) < 0,05$ quando comparado com bloco de tempo ao bloco 1 a partir do bloco 3 para o grupo OXY. (Anova de duas vias seguida do pós-teste de Sidak para A e B e Regressão linear para C).

Em relação ao **número de entradas no braço aversivo**, a ANOVA de duas vias revelou que não houve diferença estatística no tratamento [$F(1,23)=0,03$, $p=0,8$], no número de entradas no braço no treino e teste [$F(1,22)=0,4$, $p=0,5$] e da interação tratamento x número de entradas no braço $F(1,22)=0,02$, $p=0,8$] (Figura 32A).

Na avaliação do **número de entradas nos braços abertos**, a ANOVA de duas vias revelou que houve interação tratamento x número de entradas no braço [$F(1,21)=14,2$, $p=0,001$], mas não houve efeito do tratamento [$F(1,23)=3,7$, $p=0,06$] ou do número de entradas no braço no treino e teste [$F(1,21)=1,4$, $p=0,24$] (Figura 32B).

Entradas nos braços aversivo e abertos

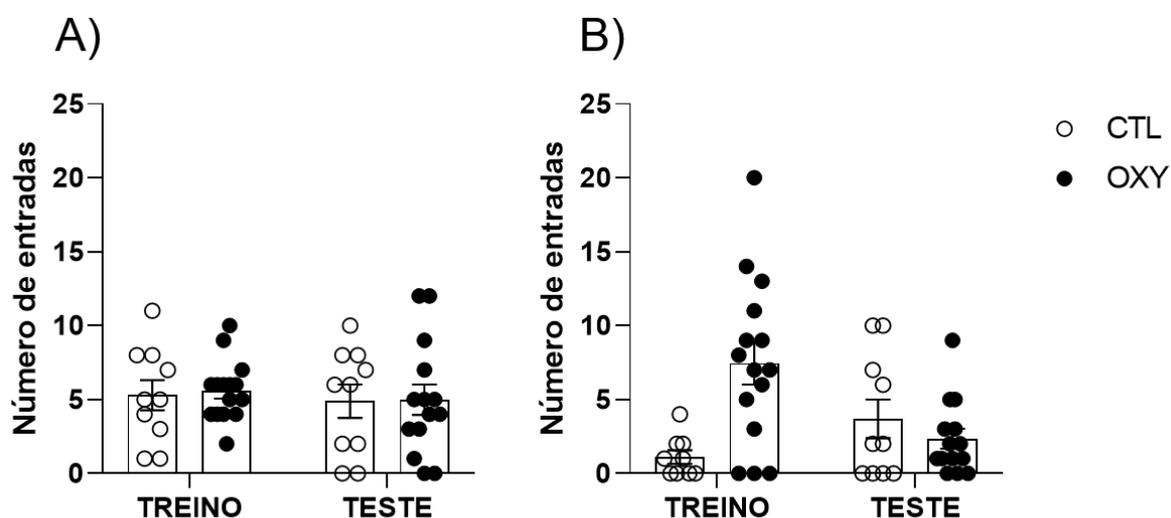


Figura 32 - Experimento II - Efeito da ocitocina sobre número de entradas no braço aversivo (A) e nos braços abertos (B) na tarefa de labirinto em cruz modificado. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. (Anova de duas vias seguida do pós-teste de Sidak).

Quando analisada a **porcentagem de tempo nos braços abertos**, a ANOVA revelou que houve efeito da fase da tarefa (treino/teste) [$F(1,11)=6,2$, $p=0,03$], não

houve efeito do tratamento [$F(1,21)=0,1$, $p=0,7$] mas houve interação tratamento x fase do tarefa [$F(1,11)=8,3$, $p=0,01$] sobre o parâmetro analisado (Figura 33). O pós-teste de Sidak mostrou que o grupo OXY apresentou diminuição da permanência no braço no teste se comparado a ele mesmo no treino ($p=0,009$).

Porcentagem de tempo nos braços abertos

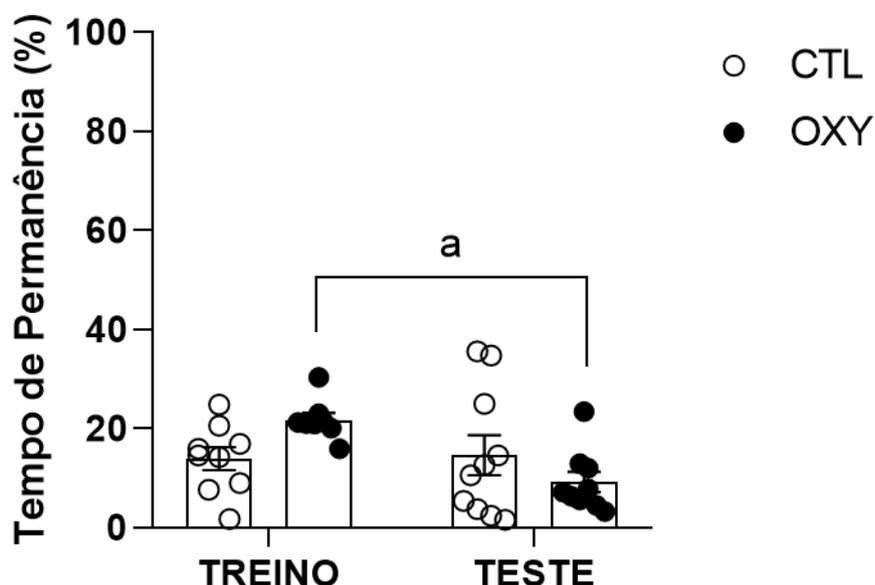


Figura 33 - Experimento II - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) nos braços abertos durante treino e teste na tarefa de labirinto em cruz modificado. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. $p(a) < 0,05$ quando comparado com treino. (Anova de duas vias seguida do pós-teste de Sidak).

Na avaliação da **análise de risco** realizada pelos animais no **braço aversivo**, **por tempo** (Figura 34A) a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito da exploração do braço no treino e teste [$F(1,21)=11,4$, $p=0,002$], mas não do tratamento [$F(1,23)=2,1$, $p=0,1$] ou da interação tratamento x exploração do braço [$F(1, 21)=1,0$, $p=0,3$]. O pós-teste de Sidak mostrou que o grupo OXY apresentou aumento do parâmetro no teste se comparados a seu respectivo no treino ($p=0,004$). Quando a análise de risco foi realizada através do **número de tentativas** (Figura 34B), a ANOVA

de duas vias revelou que não houve efeito do tratamento [$F(1,23)=0,6$, $p=0,4$], no número de tentativas de entradas no braço no treino e teste [$F(1,22)=0,08$, $p=0,7$] ou interação tratamento x número de tentativas de entradas no braço [$F(1,22)=0,2$, $p=0,6$].

Já para as análises nos **braços abertos**, na avaliação da **análise de risco por tempo** (Figura 34C), a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito na exploração do braço no treino e teste [$F(1,18)=7,6$, $p=0,01$], mas não no tratamento [$F(1,23)=0,1$, $p=0,6$] ou interação tratamento x exploração do braço [$F(1,18)=1,9$, $p=0,1$]. O pós-teste de Sidak mostrou que o grupo OXY apresentou diminuição do parâmetro no teste se comparado a ele mesmo no treino ($p=0,01$). Na avaliação da análise de risco por **tentativas** (Figura 34D), a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do número de entradas no braço no treino e teste [$F(1,23)=5,7$, $p=0,02$], mas não no tratamento [$F(1,23)=1,1$, $p=0,2$] ou interação tratamento x número de entradas no braço [$F(1,23)=2,2$, $p=0,1$]. O pós-teste de Sidak mostrou que o grupo OXY apresentou diminuição do parâmetro no teste se comparado a ele mesmo no treino ($p=0,01$).

Análise de risco dos braços aversivo e abertos

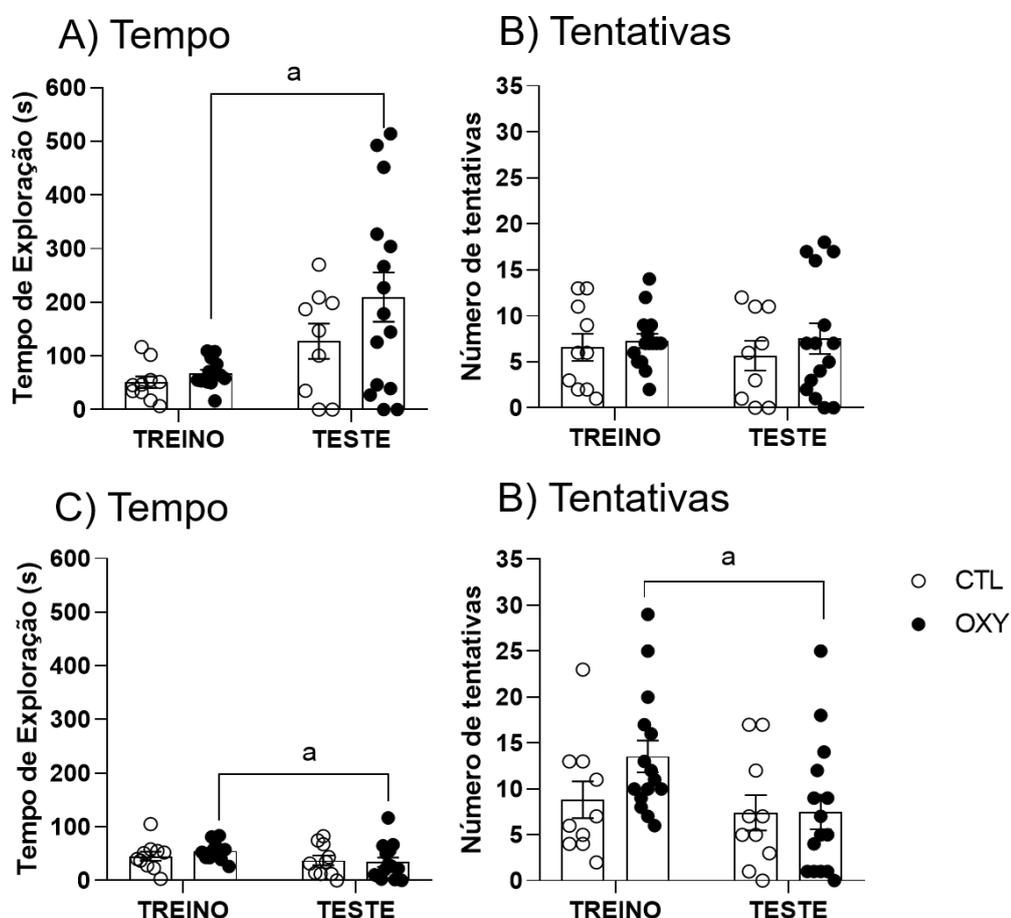


Figura 34 - Experimento II - Efeito da ocitocina sobre a análise de risco nos braços aversivo e abertos na tarefa de labirinto em cruz modificado. Análise do braço aversivo por tempo de exploração (A) e por tentativas realizadas (B) e análise dos braços abertos por tempo de exploração (C) e por tentativas realizadas (D). Os valores são expressos como média \pm E.P.M. $p(a) < 0,05$ quando comparado com treino (Anova de duas vias seguida do pós-teste de Sidak).

5.4 EXPERIMENTO 3 – EFEITO DA OCITOCINA NA EVOCAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS

Durante a etapa de treino, a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito da porcentagem de **permanência dos braços (seguro ou aversivo)** [$F(1,37)=406,7$, $p<0,0001$], mas não do tratamento [$F(1,43)=0,006$, $p=0,9$] ou interação da permanência nos braços (seguro ou aversivo) x tratamento [$F(1,43)=0,01$, $p=0,9$]. O pós-teste de Sidak mostrou que em ambos os grupos houve diminuição na

porcentagem de permanência no braço aversivo se comparado ao seguro ($p < 0,0001$ para os 2 grupos) (Figura 35A).

Na etapa de teste a ANOVA de duas vias revelou que houve diferença da permanência nos braços (seguro ou aversivo) [$F(1,37)=5,3$, $p=0,02$], mas não houve efeito do tratamento [$F(1,37)=0,01$, $p=0,9$] ou interação permanência nos braços (seguro ou aversivo) x tratamento [$F(1,37)=0,6$, $p=0,4$]. O pós-teste de Sidak mostrou que o grupo CTL apresentou diminuição na porcentagem de permanência no braço aversivo se comparado ao seguro ($p=0,04$) (Figura 35B).

Analisando a porcentagem de tempo **apenas do braço aversivo**, durante as fases treino e teste, a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do tratamento [$F(1,21)=9,8$, $p=0,004$], quanto a porcentagem de permanência no braço no treino e teste [$F(1,17)=20,4$, $p=0,0003$] e interação tratamento x porcentagem de permanência no braço [$F(1,17)=14,3$, $p=0,001$] (Figura 35C). O pós-teste de Sidak mostrou que ambos os grupos apresentaram aumento na porcentagem de permanência no braço no teste quando comparado ao treino (CTL, $p=0,03$ e OXY $p < 0,0001$), além disso na fase de teste o grupo OXY apresentou aumento no parâmetro se comparado a CTL ($p < 0,0001$). Para a análise apenas da % de tempo nos braços seguros durante as fases de treino e teste, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada.

Porcentagem de tempo nos braços seguro e aversivo

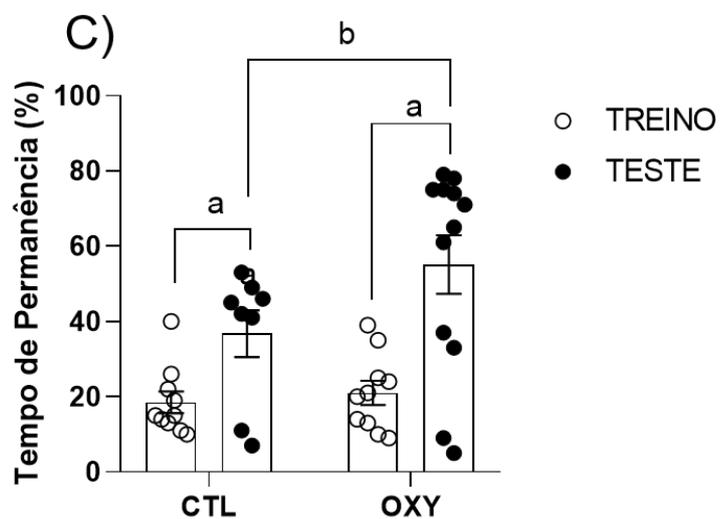
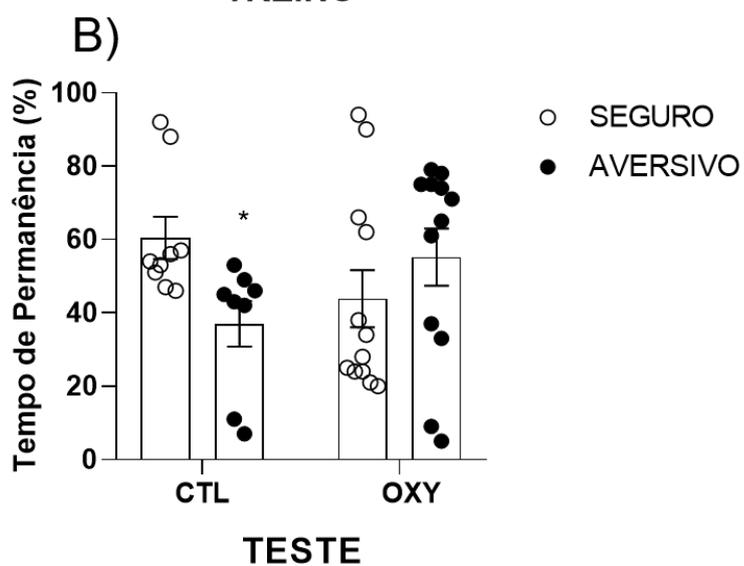
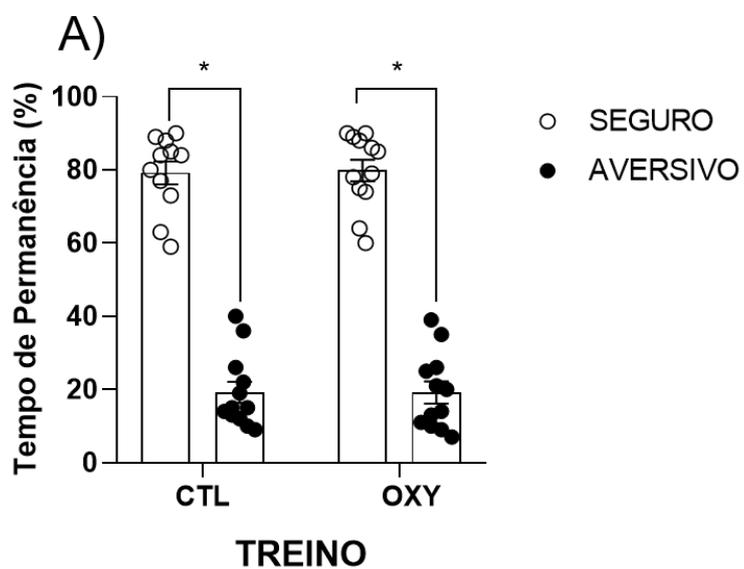


Figura 35 - Experimento III - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) na comparação dos braços seguro e aversivo durante treino (A) e teste (B) e no braço aversivo durante treino e teste (C) na tarefa de labirinto em cruz modificado. Os Valores são expressos como média \pm E.P.M. $p(-) < 0,05$ quando comparado braço aversivo com braço seguro, $p(a) < 0,05$ quando comparado com treino, $p(b) < 0,05$ quando comparado OXY com CTL. (Anova de duas vias seguida do pós-teste de Sidak).

Quando analisamos, **minuto a minuto**, a porcentagem de tempo nos **braço aversivo** durante a fase de treino, a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito da comparação entre os blocos de tempo [$F(9,194)=9,8$, $p < 0,0001$], mas não do tratamento [$F(1,22)=0,3$, $p=0,5$] ou da interação tratamento x comparação minuto a minuto [$F(9,194)=0,6$, $p=0,7$]. O pós-teste de Sidak revelou que do bloco 3 ao 10 houve gradativa diminuição da permanência no braço aversivo para o grupo CTL e OXY quando comparados ao bloco 1 {[**CTL**; ($p_5=0,0004$ $p_6=0,001$; $p_7=0,003$; $p_8 < 0,0001$; $p_9=0,0008$; $p_{10} < 0,0001$)], [**OXY**; ($p_3=0,01$; $p_4=0,01$; $p_5=0,04$; $p_6=0,0035$; $p_7=0,02$; $p_8=0,003$; $p_9=0,02$; $p_{10}=0,004$)]} (Figura 36A).

Na avaliação da fase de teste a ANOVA de duas vias não mostrou efeito do tratamento [$F(1,22)=0,01$, $p=0,8$], comparação entre os blocos de tempo [$F(9,198)=1,8$, $p=0,05$] ou na interação tratamento x comparação entre os blocos de tempo [$F(9, 198)=0,5$, $p=0,8$] (Figura 36B).

Na avaliação da equação da reta usando a regressão linear durante o treino (Figura 36C), foi verificado para o grupo CTL a equação $Y = -3,5 \cdot X + 41,60$; $R^2 0,8$; ($F= 38,0$. $DF_n=1$, $DF_d=8$, $p=0, 0,0003$) e para o grupo OXY $Y = -2,3 \cdot X + 31,9$; $R^2 0,7$; ($F= 19,8$. $DF_n=1$, $DF_d=8$, $p =0,002$). A análise mostrou ainda que as retas não diferem entre si ($F=2,5$. $DF_n=1$, $DF_d=16$, $p=0,1$).

Porcentagem de tempo no braço aversivo (60s)

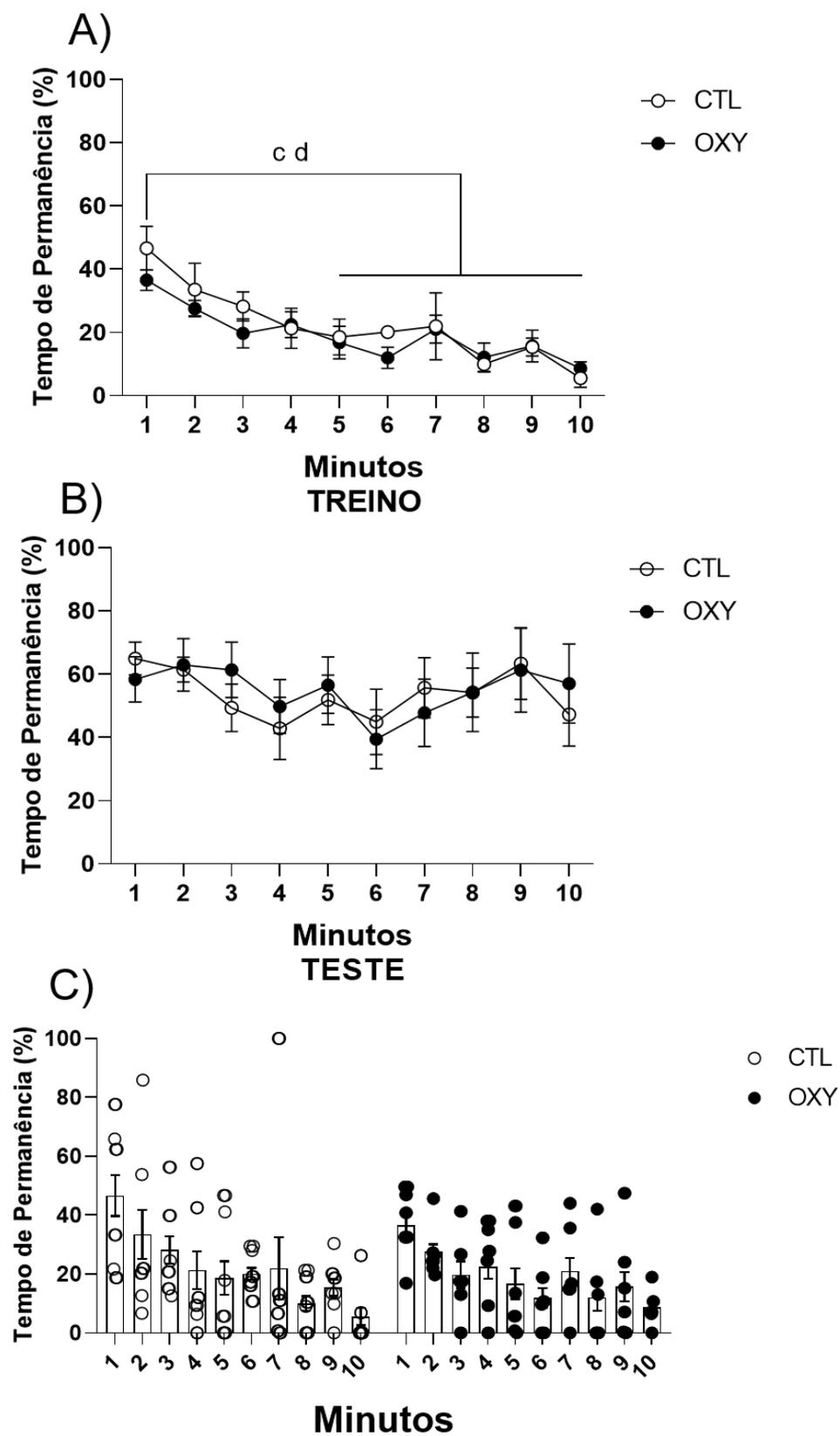


Figura 36 - Experimento III - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) no braço aversivo durante treino (A) e teste (B) e regressão linear no treino (C) na tarefa de labirinto em cruz modificado em blocos de 60 segundos. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. $p(c) < 0,05$ quando comparado com bloco de tempo em questão ao bloco 1 a partir do bloco 3 para o grupo CTL e $p(d) < 0,05$ quando comparado com bloco de tempo ao bloco 1 a partir do bloco 3 para o grupo OXY. (Anova de duas vias seguida do pós-teste de Sidak para A e B e regressão linear para C).

Em relação ao **número de entradas no braço aversivo**, a ANOVA de duas vias revelou que não efeito do tratamento [$F(1,21)=2,1$, $p=0,1$], no número de entradas no braço no treino e teste [$F(1,19)=0,1,8$, $p=0,1$] ou interação tratamento x número de entradas no braço [$F(1,19)=3,6$, $p=0,07$] (Figura 37A).

Na avaliação do **número de entradas nos braços abertos**, a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do tratamento [$F(1,22)=6,2$, $p=0,02$] e houve interação tratamento x número de entradas no braço [$F(1,18)=6,6$, $p=0,01$], mas não quanto ao número de entradas no braço no treino e teste [$F(1,18)=3,8$, $p=0,06$] (Figura 37B). O pós-teste de Sidak mostrou que no teste o grupo OXY apresentou diminuição do parâmetro se comparado ao grupo CTL ($p=0,004$).

Entradas nos braços aversivo e abertos

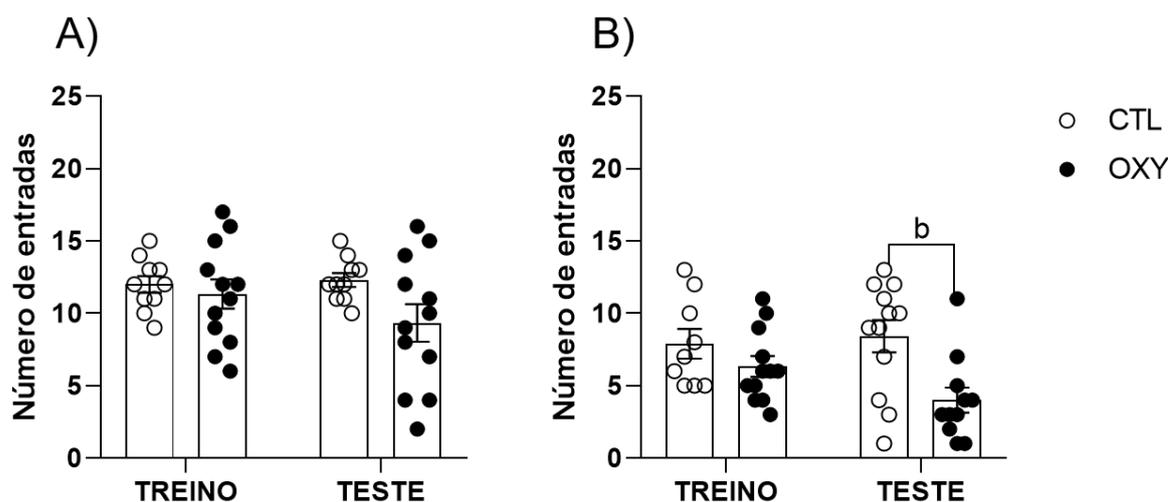


Figura 37 - Experimento III - Efeito da ocitocina sobre número de entradas no braço aversivo (A) e nos braços abertos (B) na tarefa de labirinto em cruz modificado. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. $p(b) < 0,05$ quando comparado OXY com CTL (Anova de duas vias seguida do pós-teste de Sidak).

Quando analisada a **porcentagem de tempo nos braços abertos**, a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do tratamento [$F(1,22)=5,5$, $p=0,02$] e sobre a fase da tarefa (treino/teste) [$F(1,22)=19,3$, $p=0,0002$] mas não na interação tratamento x fase do tarefa [$F(1,22)=0,2$, $p=0,5$] sobre o parâmetro analisado (Figura 38). O pós-teste de Sidak mostrou que no teste ambos os grupos apresentaram diminuição do parâmetro se comparados ao seus respectivos no treino [CTL ($p=0,02$) e OXY ($p=0,004$)]. O pós-teste mostrou ainda que na fase de teste o grupo OXY apresentou diminuição da permanência no braço se comparado ao grupo CTL ($p=0,02$).

Porcentagem de tempo nos braços abertos

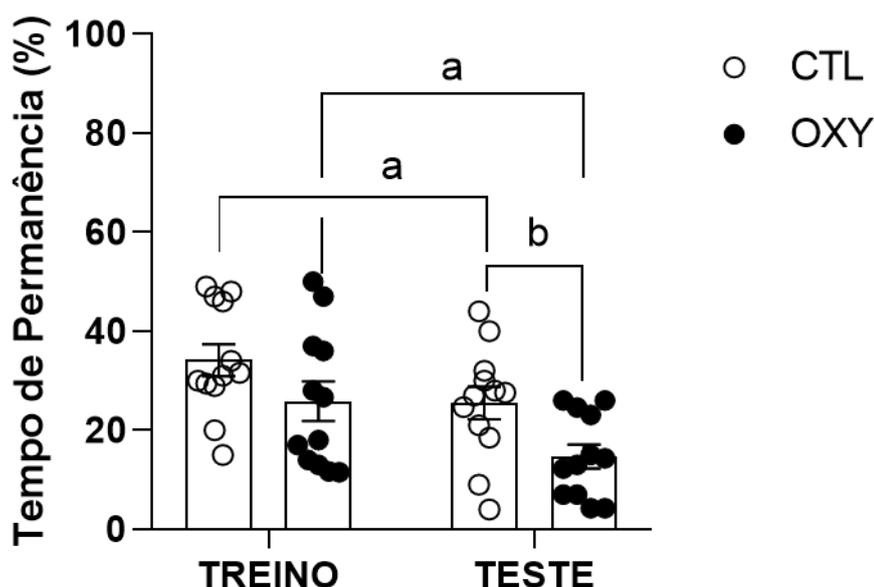


Figura 38 - Experimento III - Efeito da ocitocina sobre a permanência (em porcentagem) nos braços abertos durante treino e teste na tarefa de labirinto em cruz modificado. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. $p(a) < 0,05$ quando comparado com treino, $p(b) < 0,05$ quando comparado OXY com CTL. (Anova de duas vias seguida do pós-teste de Sidak).

Na avaliação da **análise de risco** realizada pelos animais no **braço aversivo**, **por tempo** (Figura 39A), a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito da exploração do braço no treino e teste [$F(1,20)=59,4$, $p<0,0001$], mas não no tratamento [$F(1,22)=1,2$, $p=0,2$] ou na interação tratamento x exploração do braço

[F(1,20)=2,0, p=0,1]. O pós-teste de Sidak mostrou que ambos os grupos apresentaram aumento do parâmetro no teste se comparados a seus respectivos no treino (CTL, p=0,0004 e OXY p<0,0001). Quando a análise de risco foi realizada através do **número de tentativas** (Figura 39B), a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do tratamento [F(1,22)=5,0, p=0,03] e no número de tentativas de entradas no braço no treino e teste [F(1,15)=9,9, p=0,006], mas não na interação tratamento x do número de tentativas de entradas no braço [F(1,15)=0,9, p=0,3]. O pós-teste de Sidak mostrou que no teste, o grupo OXY apresentou diminuição do parâmetro se comparado com ele mesmo no treino (p=0,01) ou ainda se comparado ao grupo CTL na fase de teste (p=0,02).

Já para as análises nos **braços abertos**, na **avaliação da análise de risco por tempo** (Figura 39C), a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do no tratamento [F(1,22)=3,7, p=0,02], mas não no número de tentativas de entradas no braço no treino e teste [F(1,21)=1,5, p=0,2] ou interação tratamento x exploração do braço [F(1,21)=1,0, p=0,3]. O pós-teste de Sidak mostrou que no teste o grupo OXY apresentou diminuição do parâmetro se comparado ao grupo CTL (p=0,03). **Da análise de risco por tentativas** (Figura 39D), a ANOVA de duas vias revelou que não houve efeito do tratamento [F(1,22)=2,1, p=0,1], no número de tentativas de entradas no braço no treino e teste [F(1,20)=3,009, p=0,09] e interação tratamento x número de tentativas de entradas no braço [F(1,20)=2,7, p=0,1].

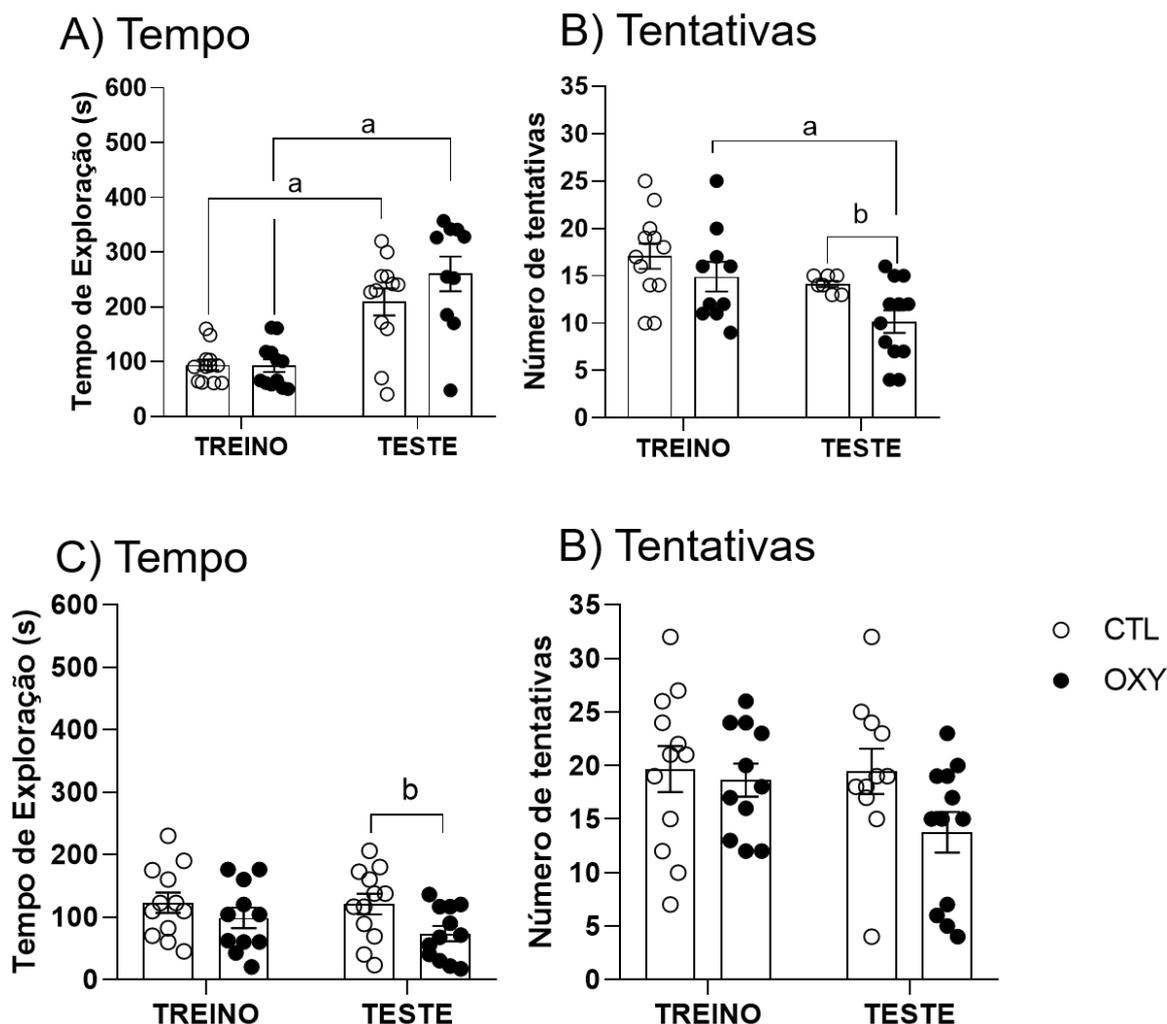


Figura 39 - Experimento III - Efeito da ocitocina sobre a análise de risco nos braços aversivo e abertos na tarefa de labirinto em cruz modificado. Análise do braço aversivo por tempo de exploração (A) e por tentativas realizadas (B) e análise dos braços abertos por tempo de exploração (C) e por tentativas realizadas (D). Os valores são expressos como média \pm E.P.M. $p(a) < 0,05$ quando comparado com treino, $p(b) < 0,05$ quando comparado OXY com CTL (Anova de duas vias seguida do pós-teste de Sidak).

5.5 EXPERIMENTO 4 – EFEITO DA OCITOCINA SOBRE IMUNORREATIVIDADE PARA C-Fos.

Para a análise da **imunorreatividade de C-Fos**, foi verificado através do teste t que nas regiões CA3 ($t=2,005$, $df=11$) (Figura 40B) e Giro denteado ($t=2,4$, $df=11$) (Figura 40C) do hipocampo foi possível verificar efeito do tratamento com ocitocina no aumento da imunorreatividade ($p=0,03$ e $p=0,01$ respectivamente), além do córtex cingulado anterior também com aumento ($t=1,8$, $df=10$) (Figura 40 D) ($p=0,04$) e

amígdala central apresentou diminuição do parâmetro para os animais OXY ($t=1,8$, $df=10$) (Figura 40F) ($p=0,04$). Já para a região CA1 ($t=1,5$, $df=10$) (Figura 40A), amígdala basolateral ($t=0,3$, $df=11$) (Figura 40E), córtex pré-límbico (Figura 40G) e córtex infralímbico (Figura 40H), não houve efeito do tratamento sobre a imunorreatividade ($p=0,07$, $p=0,3$, $p=0,3$ e $p=0,07$ respectivamente).

Imunorreatividade para C-Fos

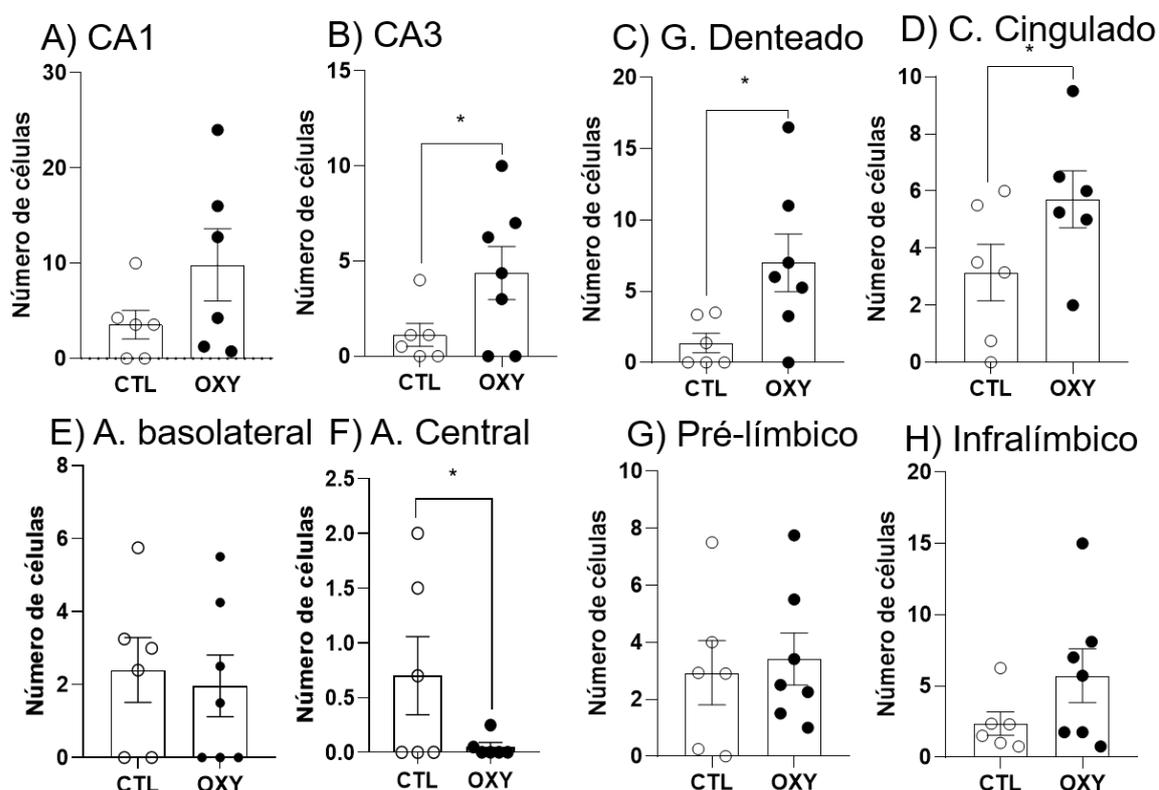
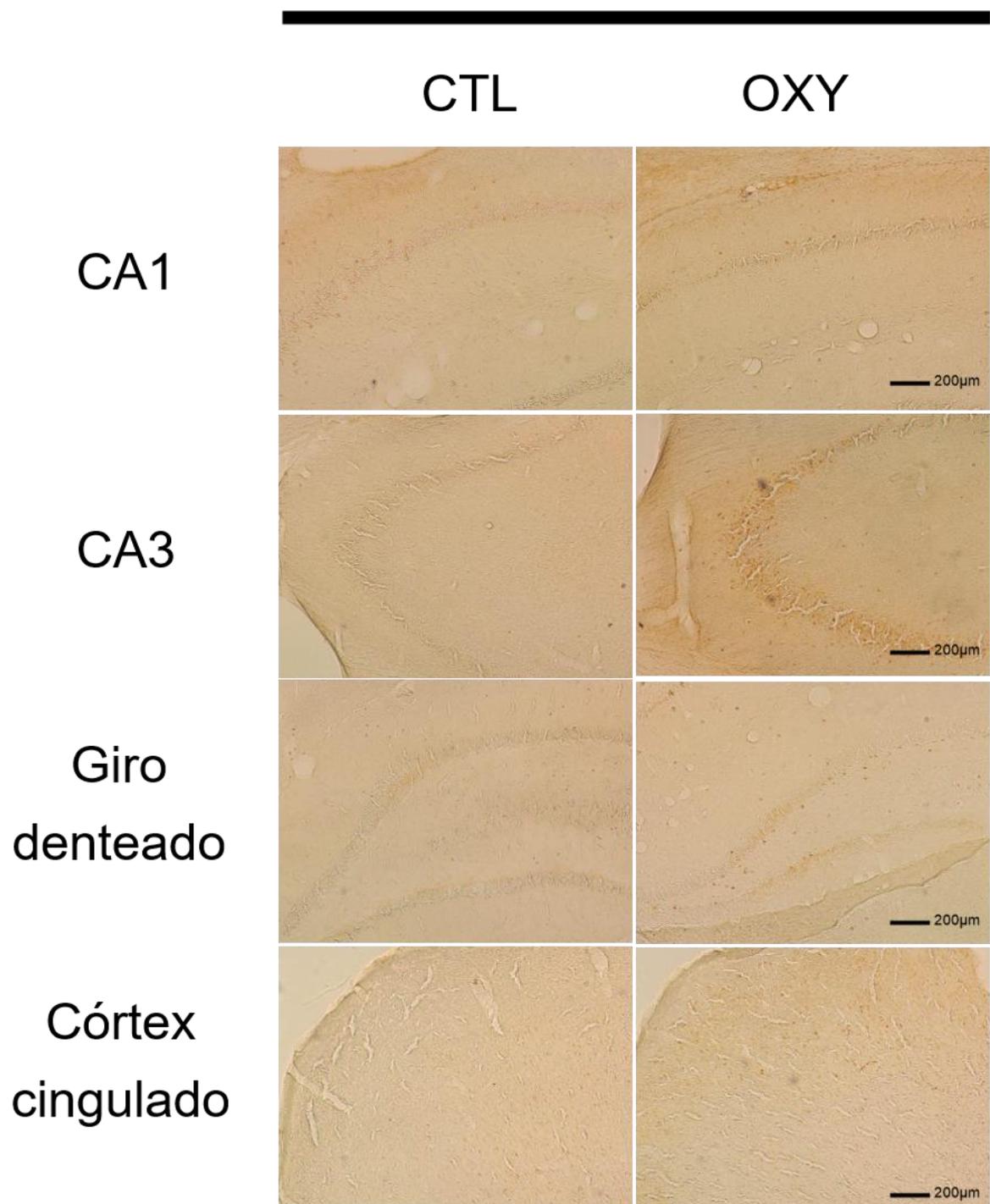


Figura 40. Experimento IV - Efeito da ocitocina sobre a imunorreatividade para C-Fos em :CA1, CA3, Giro denteado, córtex cingulado anterior, amígdala basolateral, amígdala central, córtex pré-límbico e córtex infralímbico (A, B, C, D, E, F, G e H respectivamente). Os Valores são expressos como média \pm E.P.M. $p(< 0,05$ quando comparado OXY com CTL (Teste T não-pareado)

C-Fos



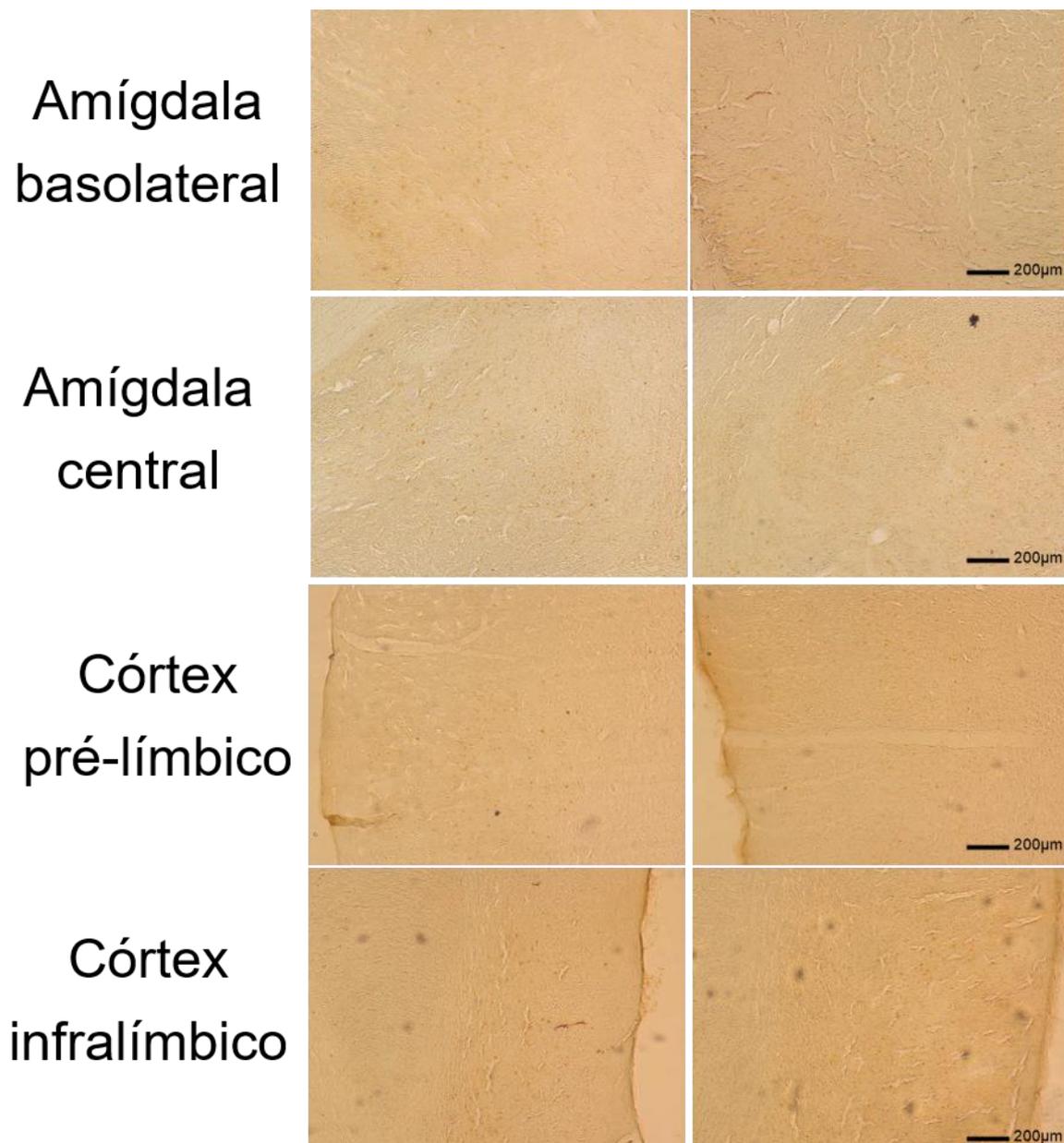


Figura 41. Experimento IV - Imagens representativas da imunorreatividade para C-Fos em :CA1, CA3, Giro denteado, córtex cingulado anterior, amígdala basolateral, amígdala central, córtex pré-límbico e córtex infralímbico com aumento de 10x.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho investigamos os efeitos da administração do hormônio ocitocina no hipocampo de ratas, sobre os diferentes processos (formação, consolidação e evocação) de uma memória aversiva, bem como alterações na atividade e plasticidade neuronal causadas pelo tratamento durante a tarefa. Nós observamos que a ocitocina é capaz de alterar a maneira como uma memória aversiva é processada em diferentes fases. Os animais tratados com ocitocina apresentam prejuízo na aquisição de uma memória aversiva, dificuldade em assimilar determinado evento como aversivo, bem como impedimento em consolidar um evento como aversivo ou ainda dificuldade em evocar uma memória aversiva, resultando em menor expressão do medo frente ao estímulo aversivo experienciado ou maior enfrentamento de situações aversivas.

A avaliação do comportamento de ratos ou camundongos no labirinto em cruz modificado possibilita o entendimento simultaneamente dos processos de memória e fatores emocionais como a ansiedade e o medo. O paradigma foi proposto por Silva; Frussa-Filho (2000) e tem sido amplamente utilizado para estudo de memória e medo em roedores.

No presente estudo, uma das avaliações que realizamos foi a distância total percorrida pelos animais durante treino e teste no labirinto em cruz modificado. Na ocasião, em nenhum dos 3 experimentos realizados foi possível verificar diferenças nos animais tanto no tratamento (OXY ou CTL), quanto na fase da tarefa (treino e teste). Dessa forma, ambos os grupos percorreram de maneira semelhante o aparato durante as 2 fases da tarefa. Isso nos apresenta 2 indicativos importantes para o trabalho. O primeiro é que não houve prejuízo motor causado pelo procedimento cirúrgico, nos informando que a área de interesse (hipocampo dorsal) foi alcançada devidamente e como a área não tem envolvimento direto com controle da atividade locomotora a atividade locomotora dos animais nos confirma que nenhuma área envolvida com a atividade locomotora foi danificada. O segundo indicativo é de que a administração de ocitocina no hipocampo não tem capacidade de produzir alterações motoras.

Existem estudos na literatura como o realizado por Bowen *et al.* (2015), no qual os pesquisadores demonstraram que a ocitocina foi capaz de alterar a atividade motora em animais. Neste, o tratamento possibilitou diminuição no tempo de imobilidade de ratos no teste de campo aberto, bem como um menor tempo para ajuste de postura no teste de reflexo de endireitamento, apresentando assim a possibilidade da ocitocina modular a atividade motora. Apesar do resultado antagônico ao que observamos em nosso trabalho, vale ressaltar que nosso desenho experimental foi diferente do deles. Bowen *et al.* (2015) realizaram a administração da ocitocina via intracerebroventricular, enquanto que no presente estudo realizamos a administração diretamente no hipocampo, essa divergência da via de administração possibilita o alcance da ocitocina em diversas regiões cerebrais que possuem receptores ocitocinérgicos e podem contribuir para uma alteração motora. Além disso, no estudo citado o experimento foi realizado em animais do sexo masculino, enquanto que no presente estudo foram utilizados animais do sexo oposto.

Em complemento, a interação da ocitocina com o sistema opióide que pode modular o sistema dopaminérgico e colinérgico, ocasionando uma ação ocitocinérgica indireta nesses sistemas resultando na mudança comportamental relatada por Quintana *et al.*, (2019). Outro ponto de divergência é que no estudo relatado, houve indução de prejuízo motor através da administração de álcool, enquanto no nosso trabalho não induzimos qualquer prejuízo motor. Semelhante ao visto por Bowen *et al.* (2015), no estudo realizado por Zhou *et al.* (2015) os mesmos também verificaram alterações motoras no teste de campo aberto sendo ocasionadas pela ocitocina, mas neste a via de administração também foi diferente, partindo para a intraperitoneal e nos levando a pensar novamente que o alcance da ocitocina em diversas áreas de maneira aleatória pode ter levado aos resultados observados, outra divergência foi que os pesquisadores utilizaram animais Sprague-Dawley, enquanto em nosso estudo utilizamos a linhagem Wistar.

Os receptores ocitocinérgicos são amplamente distribuídos, tanto periféricamente quanto centralmente (SUE CARTER *et al.*, 2020) e sendo um receptor acoplado a proteína G pode causar diferentes desfechos a depender do local do receptor e do subtipo de receptor estimulado (AL-SUHAIMI *et al.*, 2021). A estimulação do receptor tipo Gq que ocasiona a liberação de cálcio sarcoplasmático, que pode favorecer a ativação de processos intracelulares dependentes de voltagem

(KURTZEBORN; KWON; KUURE, 2019). A alta distribuição da ocitocina pode levar a um comportamento ocasionado pela soma de diferentes regiões encefálicas sendo estimuladas ou inibidas (regiões diferentes) simultaneamente pela ação direta ou indireta da ocitocina interagindo com seus receptores. Nessa perspectiva apesar de mostrar que a ocitocina pode exercer determinada função, em determinada região, torna a resposta visualizada menos específica por conta das interações com as diferentes regiões. Dessa forma, a avaliação da distância total percorrida, em nosso desenho experimental, serviu como uma avaliação para verificar se a ocitocina administrada diretamente no hipocampo teria a capacidade de produzir alterações motoras, o que não foi observado no presente estudo. Dessa forma, as alterações comportamentais observadas no estudo não foram decorrentes de alterações motoras.

Na avaliação da permanência dos animais nos braços seguro e aversivo na fase de treino, na qual avaliamos a aprendizagem dos mesmos, percebemos que nos 3 experimentos houve aprendizagem da tarefa de ambos os grupos, visto que nos 3 experimentos, durante a fase de treino, tanto o grupo CTL quanto OXY apresentaram menor tempo de permanência no braço aversivo em comparação ao seguro. De maneira semelhante durante a fase de teste, na qual avaliamos a memória dos animais, verificamos que o grupo CTL (nos 3 experimentos) continuou a apresentar menor tempo de permanência no braço aversivo em comparação ao seguro indicando que os animais do grupo recordaram do evento aversivo ocorrido no dia anterior (treino). Já os animais OXY não apresentaram diferença no tempo de permanência, entre os braços. Isso nos indica que no experimento 1 a administração da ocitocina antes do treino não afeta a aprendizagem visto que o grupo OXY se comportou semelhante ao grupo CTL, indicando que houve aprendizado por parte do grupo. Quanto aos experimentos 2 e 3, não há alterações durante o treino, pois durante a realização da tarefa nesta fase (treino) os animais ainda não receberam tratamento algum.

Para o experimento 1 (ocitocina antes do treino), a não diferença entre a permanência no braço aversivo e seguro no teste nos indica que a memória do animal foi prejudicada de alguma forma, visto que na fase de treino ele aprendeu, mas a memória adquirida, e avaliada no teste, possivelmente não foi percebida de maneira tão aversiva para esse grupo quanto foi para o CTL, levando o grupo OXY a não evitar

o braço aversivo na fase de teste. Outra possibilidade é que o tratamento com ocitocina favoreceu o enfrentamento de situações aversivas, pois os animais desse grupo apresentaram menos medo de se exporem ao braço aversivo.

Já nos experimentos 2 e 3 (ocitocina **após o treino** e ocitocina **antes do teste** respectivamente) apesar da diferença no momento de administração, o desfecho alcançado foi semelhante. No caso do experimento 2, apesar dos animais terem aprendido no treino, a memória do evento aversivo vivido pelos animais OXY possivelmente não foi consolidada como tão intensa para esse grupo como foi para o CTL. Acreditamos que o tratamento com ocitocina após a exposição de um evento aversivo diminui a capacidade de armazenamento dessa nova memória quanto a intensidade desse estímulo, prejudicando a consolidação dessa memória como aversiva, sendo essa hipótese confirmada pela não diferença vista no teste quanto a permanência nos braços aversivo e seguro. Quanto ao experimento 3 acreditamos que os animais OXY não apresentaram diferença na permanência entre o braço aversivo e seguro no teste pois a evocação da memória aversiva foi prejudicada e creditamos isso ao momento de administração da ocitocina. A infusão da droga antes da fase teste, possivelmente prejudicou a evocação da memória aversiva que foi anteriormente aprendida e consolidada. Essa hipótese corroborada pela ausência de distinção entre permanência no braço aversivo ou seguro pelo grupo OXY na fase de teste.

A ocitocina administrada antes do treino (experimento 1) pode ter atuado no hipocampo de 2 formas, o que explicaria o fenômeno visto. Inicialmente, a ativação dos neurônios hipocampais através do estímulo aversivo pode ter levado a estimulação de neurônios excitatórios hipocampais que podem ter causado o processo inicial de aprendizagem com a ativação do hipocampo e de outras áreas envolvidas como amígdala e córtex (Han *et al.*, 2019). O primeiro ponto de atuação da ocitocina pode ter sido no reforço dessa engrama inicial. Como informado por Lin; Hsu (2018), a ocitocina pode causar uma excitação hipocampal e nesse sentido o relato do trabalho é corroborado por nosso achado, visto que mesmo na presença de ocitocina exógena não houve diferença para o grupo CTL. Alternativamente, o segundo ponto que podemos destacar e que explica a aquisição prejudicada da memória prejudicada, é o fato da ocitocina também poder atuar sobre receptores excitatórios de neurônios hipocampais gabaérgicos como apontado por Leong *et al.*

(2018). A estimulação desses neurônios pode ter levado à inibição de núcleos que recebem essas projeções e estão envolvidos com a aquisição de memórias aversivas junto com o hipocampo, como córtex pré-frontal e amígdala.

No experimento 2 o prejuízo causado pela ocitocina na consolidação pode ter ocorrido por mecanismos semelhantes ao que relatamos acima. Para a realização da consolidação, um dos mecanismos necessários é a ativação hipocampal, fortalecendo sinapses existentes e/ou criando novas como dito por Klatt. (2018). Nesse sentido, Zhang *et al.* (2018) relatou que o potencial de longa duração é um dos processos de grande importância para o estabelecimento de novas memórias. Possivelmente, a ocitocina agiu sobre esse processo ao ser administrada logo após o treino, causando uma diminuição da excitação hipocampal, por estimular neurônios gabaérgicos, causando perda da performance no processo. Nossa hipótese faz sentido, visto que o potencial de longa duração é um processo que leva algumas horas para acontecer e segundo o relato de Klatt. (2018) a fase inicial desse processo pode durar por volta de 3 horas e sua fase mais tardia por volta de 24 horas.

No experimento 3 a ocitocina pode ter ocasionado um processo que é complementar ao que comentamos no experimento 2, entretanto atingindo, através de comunicações indiretas, regiões fora do hipocampo, mas que também estão envolvidas com a expressão do medo como amígdala, córtex cingulado anterior e os córtices pré-límbico e infralímbico. Sabe-se do envolvimento dessas áreas com processos de formação, consolidação, recuperação e extinção de memórias aversivas como discutido por Milton (2019) e Neugebauer (2015). Em complemento, Thompson; Neugebauer (2017) descrevem a complexa comunicação que existe entre as áreas comentadas e o hipocampo.

Durante a evocação da memória aversiva existe estimulação de neurônios glutamatérgicos no infralímbico, córtex cingulado anterior e amígdala que ocasionam uma cascata (e loop) de estimulação (nas demais porções da amígdala) e por vezes inibições que ocasionarão respostas comportamentais frente ao estímulo aversivo, como a **evitação** da ameaça ou comportamentos de imobilidade como discutido por Triana-Del Rio *et al.* (2018). Dessa maneira, podemos pressupor que a ocitocina hipocampal pode ter causado a inibição desses 'neurônios ativadores' da expressão do medo através da estimulação dos neurônios gabaérgicos hipocampais que se projetam para essas regiões. Sendo assim, a inibição desses 'neurônios ativadores'

da expressão do comportamento envolvidos com respostas frente estímulo aversivo na amígdala, pré-límbico e córtex cingulado anterior, pode ter ocasionado uma diminuição da resposta frente ao episódio que cause medo. Essa hipótese é corroborada pelo nosso achado, visto que na fase teste os animais OXY não evitaram a permanência no braço aversivo em comparação ao seguro, enquanto que no grupo CTL essa evitação foi preservada, nos indicando prejuízo na evocação da memória aversiva no grupo tratado.

Há ainda uma outra alternativa que explica e pode complementar a hipótese levantada. No córtex infralímbico há grupos de neurônios que também estão envolvidos com as memórias aversivas juntamente com o pré-límbico, como citado por Vargas; Lima; Mello-Carpes (2021). Segundo o relato de Alexandra Kredlow *et al.* (2022), esses neurônios do infralímbico estão mais envolvidos no processo de extinção de memórias e uma vez ativos podem levar a inibição da amígdala, que levaria a diminuição da resposta aversiva. Entretanto, a ocitocina que administramos também pode ter levado a estimulação da população neuronal glutamatérgica hipocampal e essa estimulação pode ter levado a ativação dos neurônios do infralímbico que como comentamos leva a diminuição da expressão do medo, que ocasionou a não diferença entre braço aversivo e seguro para o grupo OXY na fase de teste.

Os dados de avaliação entre os braços seguro e aversivo, já nos trazem indícios de como a ocitocina pode afetar a memória aversiva em diferentes etapas do processo. Dados complementares aos que apresentamos são as análises apenas do ocorrido no braço aversivo, ou seja, excluindo nesse momento o que está ocorrendo no braço seguro. Nessa avaliação, no experimento 1, verificamos que o grupo OXY não diferiu no tempo de permanência no braço aversivo se comparado treino x teste, enquanto que no grupo CTL houve essa distinção. Outra observação é que na fase de treino o grupo OXY já apresentava um maior tempo de permanência no braço. Já no experimento 2, ambos os grupos se comportaram de maneira semelhante tanto no treino quanto no teste, aumentando o tempo de permanência na etapa teste. Enquanto isso no experimento 3, semelhante ao ocorrido no 2, houve aumento na permanência no braço aversivo no teste se comparado ao treino, porém diferente daquele, neste foi possível observar uma maior permanência no braço aversivo no teste por parte do

grupo OXY se comparado a CTL. Esses resultados corroboram nossa hipótese e ao que já relatamos.

Como relatamos, a administração de ocitocina antes do treino levou a um prejuízo na aquisição da memória aversiva levando a essa maior permanência no braço aversivo por parte do grupo OXY já no treino. Durante a etapa de treino, a ocitocina além de ocasionar os processos que relatamos pode ter levado ainda a consolidação de uma memória falsa (no nosso caso seria o estímulo naturalmente aversivo não ser percebido como aversivo). Herszage; Censor (2018) relatou em seu trabalho que durante a aquisição de uma nova memória, se uma outra informação (chamada interferência) for apresentada durante o processo, esta segunda pode prejudicar a aquisição da primeira e ocasionar a consolidação de uma memória diferente.

Na presente tarefa, essa interferência não foi ocasionada por uma segunda informação e sim pelo efeito da ocitocina no momento da aquisição. Ainda em linha com o relatado por Herszage; Censor (2018) e nosso achado, a ocitocina hipocampal, através da diminuição da estimulação de núcleos envolvidos com medo que já mencionamos, pode ter causado essa interferência através da competição entre traços de memórias já existentes (como aversão natural a ambientes muito iluminados e ruídos altos) contra novas informações passíveis de serem armazenadas, causando assim perda da performance da memória. Em complemento, Alberini *et al.* (2018) comentaram em seu estudo que memórias codificadas em altos estados de excitação são melhor lembradas, principalmente se a memória estiver envolvida com questões emocionais. Nesse sentido, o comentário encontra-se em linha com nossa interpretação, visto que possivelmente a ocitocina hipocampal está diminuindo a excitação dos núcleos envolvidos com medo como a amígdala.

Já no experimento 2 e 3 foi verificado aumento na permanência no braço aversivo no teste em comparação ao treino em ambos experimentos e para ambos os grupos. Atribuímos esse comportamento novamente ao comportamento natural do animal de perceber a ausência do estímulo aversivo e passar a explorar mais o braço aversivo que agora é visto como novidade. Entretanto, assim como na relação entre os braços seguro e aversivo, as reflexões acerca do observado mudam.

Para o experimento 2, apesar de não haver distinção na permanência no braço aversivo entre OXY e CTL, se relacionarmos essa observação com os dados no seguro e aversivo no teste, percebemos que o grupo OXY se expõe mais ao aversivo ao ponto de não diferir na permanência entre os 2 braços, enquanto que o grupo CTL continua se expondo menos ao aversivo. Então os animais OXY aprendem a tarefa no treino, diminuindo a exposição no aversivo (semelhante ao CTL), mas não se recordam dela (indicado pela permanência igual na comparação seguro x aversivo no teste), mesmo assim aumentam a permanência no aversivo na comparação treino x teste. Além disso, como OXY não recordou como aconteceu no treino ele passa a aumentar a permanência no aversivo como se aquele braço fosse novidade.

A explicação que temos dessa observação é em complemento ao que já comentamos para o experimento 2 (através de alguns mecanismos que a ocitocina pode ter agido sobre). Phelps; Hofmann (2019) relatam que a consolidação inicial de uma memória, é um importante momento no qual a mesma pode ser 'editada' e relatam ainda que o uso de fármacos com potencial de afetar os processos de consolidação, se administrados logo após a aquisição pode induzir o esquecimento. No nosso estudo foi isso que verificamos, com a administração da ocitocina logo após o treino. Como comentamos, possivelmente a ocitocina ocasionou a diminuição da atividade da amígdala que culminou no esquecimento do evento aversivo. Com isso vemos a não distinção na exploração entre braços aversivo e seguro para os animais do grupo OXY.

Além disso, a interferência que comentamos também pode ter ocorrido, nesse período de consolidação. De Sousa; Chowdhury; Silva (2021), mencionaram que a aquisição de uma segunda memória durante a fase de consolidação pode formar um traço mnemônico lábil (em termos mais genéricos uma 'memória fraca'), sendo essa uma memória que provavelmente não irá gerar uma memória estável de longo prazo, mas que essa informação pode ser fortalecida se uma 'memória forte' for adquirida. No nosso caso, os animais do grupo OXY adquiriram a memória aversiva durante o treino (verificado pela diminuição da permanência no braço aversivo durante o treino na comparação seguro x aversivo).

Entretanto, durante a consolidação a ocitocina prejudicou a estabilização dessa memória recém adquirida no treino (pelo mecanismos que já comentamos), tornando-a lábil por agora possivelmente haver uma contradição se o braço é ou não aversivo,

algo semelhante ao mencionado por De Sousa; Chowdhury; Silva (2021). Em complemento, a reexposição dos animais do grupo OXY ao aparato no teste pode ter ocasionado um fortalecimento da memória de que não há estímulo aversivo. Além disso, como mencionado por Bergstrom (2016), o processo de consolidação pode levar dias (consolidação secundária), dessa maneira a reexposição dos animais no dia posterior poderia contribuir para a estabilização da memória não aversiva do braço nos animais do grupo OXY, ou ainda um favorecimento do esquecimento do evento aversivo

Já no experimento 3 o fato dos animais OXY apresentarem maior tempo de permanência no braço aversivo no teste (se comparado ao CTL) nos indica prejuízo na evocação da memória. O comportamento observado aqui foi semelhante ao visto no experimento 1 (aumento na permanência no grupo OXY se comparado ao CTL) com a diferença entre os grupos surgindo em resposta ao momento de administração da ocitocina.

A evocação como mencionado por Kensinger; Ford (2020) pode ser explicada como a habilidade de acessar uma memória criada e armazenada. No nosso estudo, acreditamos que a ocitocina pode ter prejudicado a evocação da memória aversiva. Ao haver a reexposição ao aparato que contém o estímulo aversivo, todos os neurônios envolvidos com a resposta ao medo, são ativos como dito por Josselyn; Frankland (2018), essa ativação pode ocorrer por pistas espalhadas como o próprio aparato. Além disso, em situações aversivas, a ativação da amígdala, além de inibir estruturas envolvidas com a extinção do medo, leva também a estimulação de grupos neuronais que favorecem a expressão do mesmo (TRIANA-DEL RIO *et al.*, 2018). Isso é o que ocorre normalmente na expressão do medo e foi basicamente o que observamos no grupo CTL. Maeng *et al.* (2017), relataram que a amígdala está intimamente envolvida com a expressão do medo. Além disso, Brewin (2018) demonstrou que a diminuição da atividade dessa estrutura diminui a resposta frente ao estímulo que cause medo. Nesse sentido, os animais do grupo OXY possivelmente passaram por algo semelhante.

Outra análise que realizamos foi a de fragmentar a permanência no braço aversivo em 10 blocos de tempo de 60 segundos cada, bem como a análise de regressão linear desse parâmetro. Os achados nessa análise corroboram as análises anteriores, em que observamos um retardo na curva de aprendizagem para o grupo

OXY, quando comparado ao grupo CTL. Durante a aprendizagem o hipocampo é altamente necessário (MENON, 2016). Possivelmente, a OXY pode ter prejudicado a comunicação neuronal entre o hipocampo e córtex pré-frontal. O córtex pré-frontal é altamente requerido em situações que envolvam memória e atenção, principalmente quando relacionado a estímulos aversivos como demonstrado por Raber *et al.* (2019). Além disso, Thompson; Neugebauer (2019) mencionam que existem projeções de saída do hipocampo em direção ao córtex pré-frontal, dessa maneira modulações que ocorrem no hipocampo podem impactar essa área.

Quando realizada a análise de risco, no experimento 1, na fase de teste, ambos os grupos apresentaram aumento na análise de risco em comparação a seus respectivos no treino. Já no experimento 2, apenas o grupo OXY apresentou esse aumento na comparação treino x teste, enquanto que no experimento 3 houve um comportamento semelhante ao visto no experimento 1. Esses dados nos mostram que além do prejuízo na memória que já relatamos, pode estar ocorrendo uma resposta de alteração no julgamento dos animais OXY diante situações estressoras, dependente do momento em que a OXY seja administrada. O córtex pré-frontal além de envolvido com a formação de uma memória aversiva como já comentamos, está relacionado ainda com funções cognitivas como mencionado por Kornhuber; Zoicas (2019). Entre as funções, uma delas seria o controle da tomada de decisão (Fujiyama *et al.*, 2022), que leva a produção de um comportamento adequado frente a determinado estímulo.

Vale ressaltar que, possivelmente, a tomada de decisão realizada pelos animais OXY não foi alterada como ocorrido no experimento 1. Neste, o efeito agudo da ocitocina pode ter agido sobre o sistema hipocampal e cortical, afetando a aquisição e a tomada de decisão no treino, logo após a administração do fármaco. Já no experimento 2, partimos do pressuposto que os tratados com OXY aumentaram a análise de risco no teste, por causa do possível prejuízo promovido pela ocitocina na fase de consolidação da memória.

No experimento 3 nossa interpretação do resultado é semelhante ao que discutimos sobre o experimento 1. A administração da ocitocina antes da tarefa, fase de treino para o experimento 1 e fase de teste para o experimento 3, parece ter efeitos semelhantes. Assim como no experimento 1, no 3 apesar da ocitocina não alterar o parâmetro observado, a tomada de decisão dos animais tratados foi afetada, visto que

mesmo se comportando semelhante aos animais CTL na análise de risco, os animais OXY se expõe mais ao braço aversivo, fazendo assim a escolha 'menos segura', corroborando os achados já discutidos. Vale ressaltar, que a análise de risco por tempo e por número de tentativas apresentam resultados semelhantes nos três experimentos, diferindo-se apenas para o experimento 3, que apesar do aumento no tempo de análise de risco, o grupo OXY, durante a fase de teste, apresenta menor número de tentativas. Como os animais não se recordam do evento estressor experienciado no treino, no teste não há risco a analisar pois o braço não se configura como aversivo para o grupo OXY. Apesar dos animais OXY realizarem poucas tentativas de análise, essas análises são mais longas (possivelmente pelo prejuízo na tomada de decisão), mas os animais finalizam se expondo mais (indicando prejuízo na evocação).

Outra análise que realizamos foi a entrada nos braços aversivos. Nesta avaliação verificamos que em nenhum dos 3 experimentos foram verificadas diferenças, seja entre OXY e CTL, seja na comparação treino x teste. Esta análise aparentemente não auxilia a discussão dos dados se olhada isoladamente, entretanto faz sentido se relacionarmos aos resultados como um todo. Nos 3 experimentos todos os animais se expõem poucas vezes (entradas) ao braço aversivo, mas no geral os animais OXY apesar de se exporem poucas vezes, cada exposição é mais longa, como vimos nas análises de tempo de permanência, nos indicando mais uma vez os prejuízos que já comentamos em cada um dos experimentos. Em complemento, Moaddab; Hyland; Brown (2015) mencionaram em seu trabalho que a administração ICV de ocitocina pode ser capaz de diminuir a preferência de lugar e que além do hipocampo e córtex pré-frontal, o núcleo accumbens também pode estar envolvido com o processo. Além disso, Scofield *et al.* (2016), mencionam que o núcleo accumbens é vital na integração de informações que levam à produção de comportamentos motivados, além de relacionado ainda a respostas aversivas e aprendizagem como mencionado por Chen *et al.* (2021). Dessa forma, o núcleo accumbens, córtex pré-frontal e hipocampo são estruturas críticas na aprendizagem, memória e recompensa (KUTLU; GOULD, 2016).

Existe uma complexa rede de comunicação que age em conjunto na produção do comportamento. O hipocampo que foi nosso alvo, se comunica com o córtex e a amígdala como já comentamos, mas envia projeções diretamente para o núcleo

accumbens também. Além disso, no córtex pré-frontal tanto o pré-límbico quanto infralímbico também podem projetar-se para o núcleo accumbens e há ainda projeções da amígdala para o núcleo accumbens, tanto diretamente quanto indiretamente via córtex cingulado anterior (Scofield *et al.*, 2016; Thompson; Neugebauer, 2017; Thompson; Neugebauer 2019). Nesse sentido, a ocitocina no hipocampo possivelmente estimulou os neurônios glutamatérgicos do hipocampo, que estimularam o núcleo accumbens, mas paralelamente pode ter ocorrido também a estimulação de neurônios glutamatérgicos do infralímbico que se projetam para o núcleo accumbens, reforçando a estimulação do mesmo.

Trazendo esses pressupostos para nosso estudo, podemos perceber que os animais CTL de maneira geral tendem a evitar o braço aversivo, optando então por manter-se no seguro, enquanto que os animais OXY tendem a se expor mais ao braço aversivo de forma a não diferir do seguro, nos indicando que possivelmente a ocitocina hipocampal também foi capaz de diminuir a preferência do animal pelo lugar (braço seguro a citar) e possivelmente produziu um comportamento motivado, que no caso seria a permanência no braço aversivo visto como 'novo' por conta dos prejuízos causados na memória que comentamos.

Quando avaliamos o comportamento de permanência nos braços abertos, observamos que não há diferenças entre os grupos OXY e CTL em nenhum dos três experimentos nas fases de treino e teste, mostrando que a administração da OXY no hipocampo de ratas não altera o comportamento de ansiedade dos animais. Esse achado pode ser melhor visualizado no experimento 1, quando os animais são tratados com OXY antes mesmo de ser exposto ao aparato. Assim, de maneira geral, o OXY hipocampal foi capaz de prejudicar as fases de aquisição e evocação de uma memória aversiva, sem alterar a resposta do comportamento de ansiedade dos animais.

Nas análises da imunorreatividade para C-fos realizadas no experimento 4, vimos que a administração de ocitocina no hipocampo estimulou de maneira diferencial as sub-regiões do mesmo, onde CA3 e giro denteado apresentaram aumento da atividade, enquanto em CA1 não foi observado efeito do tratamento. A maior atividade da ocitocina que verificamos em CA3 e no giro denteado, corrobora a estudos anteriores ao nosso, como o de Lin; Hsu, (2018). Neste, os autores comentam que em roedores, estas regiões são as que apresentam a maior predominância de

expressão de receptores ocitocinérgicos no hipocampo. Além disso, os autores comentam ainda que a região CA1 está intimamente relacionada ao potencial de longa duração que por sua vez é relacionado ao processo de formação de memórias. Diante disso, acreditamos que possivelmente a injeção da ocitocina no hipocampo pode ter estimulado a atividade das 3 regiões hipocámpais. Acreditamos nisso por conta do aumento da marcação para C-fos em CA3 e giro denteado. Entretanto, a estimulação de interneurônios gabaérgicos em CA3 pode ter ocasionado diminuição da atividade CA1. Dessa forma, possivelmente não foi verificada diferenças do tratamento nesta região por conta do equilíbrio entre ativação direta da ocitocina administrada contra a inibição originada da estimulação gabaérgica vinda dos interneurônios de CA3. Essa não diferença pode tender a acreditar que não houve então efeito da ocitocina sobre a memória, visto que em CA1 (e sua relação com o potencial de longa duração) não houve diferença entre OXY e CTL.

Contudo ao relacionarmos as observações das regiões hipocámpais com o ocorrido na amígdala central, que apresentou diminuição da atividade nos animais OXY se comparados a CTL, podemos inferir que os animais OXY apresentaram menos comportamento de medo, mesmo aprendendo de forma semelhante a CTL (por conta da não diferença de atividade em CA1). Assim, nós hipotetizamos que, visto que no experimento 1 (experimento no qual foi baseado o experimento 4), os animais OXY e CTL aprenderam a tarefa de maneira semelhante e neuroquimicamente também observamos isso por conta da atividade similar em CA1, contudo vimos diferenças nas respostas comportamentais frente ao estímulo aversivo e isso por ser correlacionado ao observado na amígdala central. Possivelmente o aumento na atividade dos neurônios glutamatérgicos em CA3 pode ter aumentado a estimulação de interneurônios gabaérgicos em CA3 e estes por sua vez podem ter interagido com a amígdala central, causando a diminuição da atividade da mesma, ocasionando menor marcação para C-fos neste núcleo no experimento 4 e corroborando a observação comportamental que vimos no experimento 1, onde os animais do grupo OXY apresentaram diminuição da resposta ao medo. Triana-Del Rio et al., (2018), comenta em seu estudo que a amígdala central é um dos principais núcleos de saída da amígdala no que diz respeito as respostas relacionadas ao medo.

Em complemento, Wang; Barbas, (2018) relatam que quando a amígdala é hiperestimulada, essa atividade aumentada pode facilitar a geração de respostas

aversivas, nesse sentido a diminuição da atividade do núcleo em questão pode levar a uma diminuição da resposta aversiva, corroborando tanto ao nosso achado comportamental, quanto ao neuroquímico. Nesse sentido, o presente trabalho sugere que a diminuição da atividade da amígdala central levou a diminuição da resposta comportamental frente ao medo, que foi o observado no experimento 1, no qual os animais OXY mesmo aprendendo a tarefa permaneceram por mais tempo no braço aversivo nos indicando menos medo, e essa mudança comportamental ocorreu por conta das alterações neuroquímicas que verificamos.

Outra alteração neuroquímica que verificamos para C-fos em resposta a administração de ocitocina no hipocampo, foi aumento na atividade do córtex cingulado anterior. Como comentado por Ressler, (2020), o córtex cingulado é envolvido tanto com a expressão quanto com a recordação de memórias aversivas. A estimulação dessa região pode causar aumento na estimulação da amígdala que por fim pode ocasionar a resposta comportamental ao medo como relatado por Keum; Shin, (2019). Em linha com esse comentário, Twarkowski et al., (2022) relata que a inibição do hipocampo pode causar um aumento da atividade do cingulado e que essa hiperatividade pode ser responsável por fortalecer memórias aversivas.

A primeira vista esta via de ação parece contrastar com nossos achados, visto que verificamos aumento de atividade tanto no hipocampo quanto no cingulado, entretanto é válido lembrar que no cingulado existem tanto neurônios glutamatérgicos como gabaérgicos, como descrito por Triana-Del Rio et al., (2018). Na ausência de estímulo aversivo os neurônios glutamatérgicos encontram-se inibidos tonicamente pelos gabaérgicos da mesma região, já na presença do estímulo há um reforço na atividade dos núcleos glutamatérgicos que por sua vez ocasionam alta atividade da amígdala basolateral, gerando a resposta comportamental ao medo. Em nosso estudo, acreditamos que a estimulação dos neurônios piramidais de CA3 pela ação da ocitocina, pode ter ocasionado aumento da estimulação dos neurônios gabaérgicos do cingulado, causando aumento para a imunorreatividade para C-fos destes e aumentando o tônus inibitório sobre os glutamatérgicos. Em complemento, como estes núcleos glutamatérgicos são responsáveis por causar aumento na atividade da amígdala basolateral, nossa hipótese explica ainda a não verificação de efeito da ocitocina sobre esta porção da amígdala, visto que um dos principais inputs

excitatórios (neurônios glutamatérgicos do cíngulo) está inibido, deixando a porção basolateral da amígdala com atividade em níveis normais.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a ocitocina administrada no hipocampo de ratas é capaz de causar alterações comportamentais envolvidas com a memória. Durante a aprendizagem, a ocitocina causou perda da performance sobre a tarefa realizada, ocasionando aprendizagem menos eficiente. Verificamos ainda que a ocitocina no hipocampo causa prejuízos na aquisição, consolidação e evocação de uma memória aversiva. Além disso, nossa análise neuroquímica revelou que a ocitocina administrada no hipocampo ocasionou aumento na atividade do giro denteado, CA3 e córtex cingulado, bem como diminuição do parâmetro na amígdala central corroborando aos achados comportamentais observados. Por fim vimos ainda que a ocitocina não alterou o comportamento tipo ansioso dos animais tratados, bem como também não foi capaz de causar alterações motoras nos mesmos.

LIMITAÇÕES E DESAFIOS

Um dos desafios enfrentados para a execução do presente trabalho foi o período de pandemia do COVID-19 que nos impossibilitou de realizar os experimentos necessários por quase 2 anos. Um outro desafio que tivemos, foi em tentar manter o número de animais por caixa fixo ao longo do experimento, visto que em alguns momentos os animais morriam durante ou após o procedimento cirúrgico, diminuindo o N por caixa,

Nesse sentido, percebemos um viés, visto a possibilidade da estimulação da ocitocina endógena pelo contato dos animais. Para minimizar o viés, os tratamentos por caixa foram aleatorizados, diluindo o viés ao longo do experimento. Ainda sobre o número de animais, houveram momentos nos quais os animais removiam o capacete estereotáxico, impossibilitando os animais de continuarem em experimento e prejudicando tanto nosso N total, quanto por caixa.

Como limitações do nosso trabalho, relatamos principalmente a dificuldade em translacionar nosso resultado para observações em humanos, principalmente pelo método de administração que optamos, no qual uma craniotomia em seres humanos

é um procedimento mais complexo e invasivo. Uma outra limitação que trazemos, é que apesar de nossas hipóteses, não podemos afirmar com nosso estudo que a via gabaérgica que comentamos está sendo ativa, visto que não realizamos a marcação para tal.

REFERÊNCIAS

- AL-SUHAIMI, E. A. et al. Emerging trends in the delivery of nanoformulated oxytocin across Blood-Brain barrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 609, p. 121141, 20 nov. 2021.
- ALBERINI, C. M. et al. **Astrocyte glycogen and lactate: New insights into learning and memory mechanisms** *GLIA* John Wiley and Sons Inc., , 1 jun. 2018.
- ALEXANDRA KREDLOW, M. et al. Prefrontal cortex, amygdala, and threat processing: implications for PTSD. **Neuropsychopharmacology**, v. 47, n. 1, p. 247, 1 jan. 2022.
- ALTHAMMER, F.; JIRIKOWSKI, G.; GRINEVICH, V. The oxytocin system of mice and men—Similarities and discrepancies of oxytocinergic modulation in rodents and primates. **Peptides**, v. 109, p. 1–8, 1 nov. 2018.
- ARAKAWA, H. **Sensorimotor developmental factors influencing the performance of laboratory rodents on learning and memory** *Behavioural Brain Research* Elsevier B.V., , 16 dez. 2019.
- ARROWSMITH, S.; WRAY, S. Oxytocin: its mechanism of action and receptor signalling in the myometrium. **Journal of neuroendocrinology**, v. 26, n. 6, p. 356–369, 2014.
- ASHER, M.; ASNAANI, A.; ADERKA, I. M. **Gender differences in social anxiety disorder: A review** *Clinical Psychology Review* Elsevier Inc., , 1 ago. 2017.
- ASOK, A. et al. **Molecular Mechanisms of the Memory Trace** *Trends in Neurosciences* Elsevier Ltd, , 1 jan. 2019.
- BABAEI, F.; MIRZABABAEI, M.; NASSIRI-ASL, M. **Quercetin in Food: Possible Mechanisms of Its Effect on Memory** *Journal of Food Science* Blackwell Publishing Inc., , 1 set. 2018.
- BEKINSCHTEIN, P.; WEISSTAUB, N. Role of PFC during retrieval of recognition memory in rodents. **Journal of physiology, Paris**, v. 108, n. 4–6, p. 252–255, 1 set. 2014.
- BELL, A. F.; ERICKSON, E. N.; CARTER, C. S. BEYOND LABOR: THE ROLE OF NATURAL AND SYNTHETIC OXYTOCIN IN THE TRANSITION TO MOTHERHOOD. **Journal of midwifery & women's health**, v. 59, n. 1, p. 35, 2014.
- BERGSTROM, H. C. **The neurocircuitry of remote cued fear memory** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* Elsevier Ltd, , 1 dez. 2016.
- BIAN, X. L. et al. Anterior Cingulate Cortex to Ventral Hippocampus Circuit Mediates Contextual Fear Generalization. **The Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 29, p. 5728, 7 jul. 2019.
- BLAISDELL, A. P. **Mental imagery in animals: Learning, memory, and decision-making in the face of missing information** *Learning and Behavior* Springer New York LLC, , 15 set. 2019.
- BLISS, T. V. P. et al. Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and

chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience** 2016 17:8, v. 17, n. 8, p. 485–496, 16 jun. 2016.

BOSTANCIKLIOĞLU, M. Neuromodulation of Memory Formation and Extinction. **Current neurovascular research**, v. 17, n. 3, p. 319–326, 22 abr. 2020.

BOWEN, M. T. et al. Oxytocin prevents ethanol actions at δ subunit-containing GABAA receptors and attenuates ethanol-induced motor impairment in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 10, p. 3104–3109, 10 mar. 2015.

BRANDAÑO, L. E. M. et al. Passiflora cincinnata Extract Delays the Development of Motor Signs and Prevents Dopaminergic Loss in a Mice Model of Parkinson's Disease. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

BREWIN, C. R. **Memory and Forgetting** **Current Psychiatry Reports** Current Medicine Group LLC 1, , 1 out. 2018.

BYERS, S. L. et al. Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 35538, 13 abr. 2012.

CALDWELL, H. K. Oxytocin and Vasopressin: Powerful Regulators of Social Behavior. **Neuroscientist**, v. 23, n. 5, p. 517–528, 1 out. 2017.

ÇALIŞKAN, E.; ŞAHİN, M. N.; GÜLDAĞ, M. A. Focus: Rare Disease: Oxytocin and Oxytocin Receptor Gene Regulation in Williams Syndrome: A Systematic Review. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 94, n. 4, p. 623, 1 dez. 2021.

CARTER, C. S. **The oxytocin-vasopressin pathway in the context of love and fear** **Frontiers in Endocrinology** Frontiers Media S.A., , 22 dez. 2017.

CHEN, R. et al. Decoding molecular and cellular heterogeneity of mouse nucleus accumbens. **Nature neuroscience**, v. 24, n. 12, p. 1757, 1 dez. 2021.

CHU, C. et al. The microbiota regulate neuronal function and fear extinction learning. **Nature**, v. 574, n. 7779, p. 543–548, 24 out. 2019.

COMERAS, L. B.; HERZOG, H.; TASAN, R. O. Neuropeptides at the crossroad of fear and hunger: A special focus on neuropeptide y. In: **Annals of the New York Academy of Sciences**. [s.l.] Blackwell Publishing Inc., 2019. v. 1455p. 59–80.

CONNOR, S. A.; WANG, Y. T. A Place at the Table: LTD as a Mediator of Memory Genesis. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 22, n. 4, p. 359–371, 1 ago. 2016.

DE QUERVAIN, D.; SCHWABE, L.; ROOZENDAAL, B. **Stress, glucocorticoids and memory: Implications for treating fear-related disorders** **Nature Reviews Neuroscience** Nature Publishing Group, , 15 dez. 2016.

DE SOUSA, A. F.; CHOWDHURY, A.; SILVA, A. J. Dimensions and mechanisms of memory organization. **Neuron**, v. 109, n. 17, p. 2649, 9 set. 2021.

DEMOULIN, C.; KOLINSKY, R. Does learning to read shape verbal working memory? **Psychonomic bulletin & review**, v. 23, n. 3, p. 703–722, 1 jun. 2016.

DENARDO, L. A. et al. Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote

memory retrieval. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 460–469, 1 mar. 2019.

DU, K. et al. mRNA and miRNA profiles in the nucleus accumbens are related to fear memory and anxiety induced by physical or psychological stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 118, p. 44–65, 1 nov. 2019.

DUMAIS, K. M.; VEENEMA, A. H. Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: sex differences and sex-specific regulation of social behavior. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 40, p. 1, 1 jan. 2016.

DUVARCI, S.; POPA, D.; PARÉ, D. Central Amygdala Activity during Fear Conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 289, 1 jan. 2011.

EICHENBAUM, H. Prefrontal-hippocampal interactions in episodic memory. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 18, n. 9, p. 547–558, 21 ago. 2017a.

EICHENBAUM, H. **On the Integration of Space, Time, and Memory** NeuronCell Press, , 30 ago. 2017b.

FELDMAN, R. et al. **Oxytocin Pathway Genes: Evolutionary Ancient System Impacting on Human Affiliation, Sociality, and Psychopathology** Biological Psychiatry Elsevier USA, , 1 fev. 2016.

FELDMAN, R. **The Neurobiology of Human Attachments** Trends in Cognitive Sciences Elsevier Ltd, , 1 fev. 2017.

FERNÁNDEZ, R. S. et al. Interference conditions of the reconsolidation process in humans: The role of valence and different memory systems. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 10, n. DEC2016, 20 dez. 2016.

FUJIYAMA, H. et al. Influence of tDCS over right inferior frontal gyrus and pre-supplementary motor area on perceptual decision-making and response inhibition: A healthy ageing perspective. **Neurobiology of Aging**, v. 109, p. 11–21, 1 jan. 2022.

GARCIA, A. M. B.; CARDENAS, F. P.; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiology & Behavior**, v. 85, n. 3, p. 265–270, 30 jun. 2005.

GE, J.; CAI, Y.; PAN, Z. Z. Synaptic plasticity in two cell types of central amygdala for regulation of emotion and pain. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 16, p. 997360, 26 out. 2022.

GERLICHER, A. M. V.; TÜSCHER, O.; KALISCH, R. L-DOPA improves extinction memory retrieval after successful fear extinction. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 12, p. 3401–3412, 1 dez. 2019.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: Structure, function, and regulation. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 629–683, 2001.

GUIMARÃES MARQUES, M. J. et al. Long-term potentiation decay and poor long-lasting memory process in the wild rodents proechimys from Brazil's amazon rainforest. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, 23 jan. 2018.

HAAKER, J. et al. **Making translation work: Harmonizing cross-species methodology in the behavioural neuroscience of Pavlovian fear conditioning** Neuroscience and Biobehavioral Reviews Elsevier Ltd, , 1 dez. 2019.

HAMPTON, R. R.; ENGELBERG, J. W. M.; BRADY, R. J. Explicit memory and cognition in monkeys. **Neuropsychologia**, v. 138, p. 107326, 2 fev. 2020.

HAN, R. WEN et al. Nociceptin impairs acquisition of novel object recognition memory in perirhinal cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 162, p. 9–14, 1 jul. 2019.

HASAN, M. T. et al. A Fear Memory Engram and Its Plasticity in the Hypothalamic Oxytocin System. **Neuron**, v. 103, n. 1, p. 133- 146.e8, 3 jul. 2019.

HERSZAGE, J.; CENSOR, N. **Modulation of Learning and Memory: A Shared Framework for Interference and Generalization** *Neuroscience* Elsevier Ltd, , 10 nov. 2018.

HINE, K.; TSUSHIMA, Y. Not explicit but implicit memory is influenced by individual perception style. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2018.

HOLTMAAT, A.; CARONI, P. **Functional and structural underpinnings of neuronal assembly formation in learning** *Nature Neuroscience* Nature Publishing Group, , 1 dez. 2016.

IZQUIERDO, I. **Memória**. 2º Edição ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

JIANG, Y. et al. Stress adaptation upregulates oxytocin within hypothalamo-vagal neurocircuits. **Neuroscience**, v. 390, p. 198, 10 out. 2018.

JONES, C. et al. Oxytocin and social functioning. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 193–201, 2017.

JOSELYN, S. A.; FRANKLAND, P. W. **Memory Allocation: Mechanisms and Function** *Annual Review of Neuroscience* Annual Reviews Inc., , 8 jul. 2018.

JUREK, B.; NEUMANN, I. D. The oxytocin receptor: From intracellular signaling to behavior. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1805–1908, 1 jul. 2018.

KENDRICK, K. M.; GUASTELLA, A. J.; BECKER, B. Overview of human oxytocin research. In: **Current Topics in Behavioral Neurosciences**. [s.l.] Springer Verlag, 2018. v. 35p. 321–348.

KENSINGER, E. A.; FORD, J. H. Retrieval of Emotional Events from Memory. **Annual Review of Psychology**, v. 71, p. 251–272, 6 jan. 2020.

KEUM, S.; SHIN, H. S. Neural Basis of Observational Fear Learning: A Potential Model of Affective Empathy. **Neuron**, v. 104, n. 1, p. 78–86, 9 out. 2019.

KIDA, S. **Reconsolidation/destabilization, extinction and forgetting of fear memory as therapeutic targets for PTSD** *Psychopharmacology* Springer Verlag, , 1 jan. 2019.

KIM, I. BIN; PARK, S. C. The Entorhinal Cortex and Adult Neurogenesis in Major Depression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11725, 1 nov. 2021.

KLATT, E. C. **The human interface of biomedical informatics** *Journal of Pathology Informatics* Wolters Kluwer Medknow Publications, , 1 jan. 2018.

KLINGMÜLLER, A.; CAPLAN, J. B.; SOMMER, T. Intrusions in episodic memory:

reconsolidation or interference? **Learning & Memory**, v. 24, n. 5, p. 216, 1 maio 2017.

KLOOSTER, N. B.; TRANEL, D.; DUFF, M. C. The hippocampus and semantic memory over time. **Brain and Language**, v. 201, p. 104711, 1 fev. 2020.

KOHLHOFF, J. et al. Oxytocin receptor gene (OXTR) polymorphisms and social, emotional and behavioral functioning in children and adolescents: A systematic narrative review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 135, p. 104573, 1 abr. 2022.

KONDRAKIEWICZ, K. et al. Social Transfer of Fear in Rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 90, n. 1, 1 dez. 2019.

KORNHUBER, J.; ZOICAS, I. Neuropeptide Y reduces expression of social fear via simultaneous activation of Y1 and Y2 receptors. **Journal of Psychopharmacology**, v. 33, n. 12, p. 1533–1539, 1 dez. 2019.

KURTZEBORN, K.; KWON, H. N.; KUURE, S. MAPK/ERK Signaling in Regulation of Renal Differentiation. **International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 1779**, v. 20, n. 7, p. 1779, 10 abr. 2019.

KUTLU, M. G.; GOULD, T. J. **Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: Contributions to development and maintenance of addiction** Learning and Memory Cold Spring Harbor Laboratory Press, , 1 out. 2016.

LEÃO, A. H. F. F. et al. Hippocampal-dependent memory in the plus-maze discriminative avoidance task: The role of spatial cues and CA1 activity. **Behavioural Brain Research**, v. 304, p. 24–33, 1 maio 2016.

LEE, M. R.; JAYANT, R. D. Penetration of the Blood-Brain-Barrier by Peripheral Neuropeptides: New Approaches to Enhancing Transport and Endogenous Expression. **Cell and tissue research**, v. 375, n. 1, p. 287, 28 jan. 2019.

LEE, S. Y. et al. Oxytocin Protects Hippocampal Memory and Plasticity from Uncontrollable Stress. **Scientific Reports**, v. 5, 21 dez. 2015.

LEONG, K. C. et al. Oxytocin and Rodent Models of Addiction. In: **International Review of Neurobiology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2018. v. 140p. 201–247.

LEWIS, S. **Learning and memory: Memories take the sub-way** Nature Reviews Neuroscience Nature Publishing Group, , 19 set. 2017.

LI, X. H. et al. Oxytocin in the anterior cingulate cortex attenuates neuropathic pain and emotional anxiety by inhibiting presynaptic long-term potentiation. **Cell Reports**, v. 36, n. 3, 20 jul. 2021.

LIESTER, M. B. Personality changes following heart transplantation: The role of cellular memory. **Medical Hypotheses**, v. 135, p. 109468, 1 fev. 2020.

LIN, Y. T.; HSU, K. SEN. Oxytocin receptor signaling in the hippocampus: Role in regulating neuronal excitability, network oscillatory activity, synaptic plasticity and social memory. **Progress in Neurobiology**, v. 171, p. 1–14, 1 dez. 2018.

LIU, C. M. et al. Sex differences and estrous influences on oxytocin control of food intake. **Neuroscience**, v. 447, p. 63, 11 nov. 2020.

- MACDONALD, K. J.; COTE, K. A. Contributions of post-learning REM and NREM sleep to memory retrieval. **Sleep medicine reviews**, v. 59, 1 out. 2021.
- MAEJIMA, Y. et al. The Anorexigenic Neural Pathways of Oxytocin and Their Clinical Implication. **Neuroendocrinology**, v. 107, n. 1, p. 91–104, 1 jul. 2018.
- MAENG, L. Y. et al. Estradiol shifts interactions between the infralimbic cortex and central amygdala to enhance fear extinction memory in female rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 1–2, p. 163–175, 1 jan. 2017.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4 A, p. 609–614, 2002.
- MENON, V. Memory and cognitive control circuits in mathematical cognition and learning. **Progress in brain research**, v. 227, p. 159, 1 jan. 2016.
- MERZ, C. J.; WOLF, O. T. How stress hormones shape memories of fear and anxiety in humans. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 142, p. 104901, 1 nov. 2022.
- MILTON, A. L. **Fear not: Recent advances in understanding the neural basis of fear memories and implications for treatment development [version 1; peer review: 3 approved]**F1000ResearchF1000 Research Ltd, , 2019.
- MINAMI, S.; KIYOKAWA, Y.; TAKEUCHI, Y. The lateral intercalated cell mass of the amygdala is activated during social buffering of conditioned fear responses in male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 372, p. 112065, 17 out. 2019.
- MOADDAB, M.; HYLAND, B. I.; BROWN, C. H. Oxytocin enhances the expression of morphine-induced conditioned place preference in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 53, p. 159–169, 1 mar. 2015.
- MOSCOVITCH, M. et al. Episodic memory and beyond: The hippocampus and neocortex in transformation. **Annual Review of Psychology**, v. 67, p. 105–134, 4 jan. 2016.
- MUNGUBA, H. et al. Pre-training anandamide infusion within the basolateral amygdala impairs plus-maze discriminative avoidance task in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 95, n. 4, p. 527–533, 1 maio 2011.
- NEUGEBAUER, V. 15. Amygdala pain mechanisms. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 227, p. 261, 2015.
- NEUGEBAUER, V. et al. Amygdala, neuropeptides, and chronic pain-related affective behaviors. **Neuropharmacology**, v. 170, p. 108052, 6 jun. 2020.
- NOYES, N. C.; PHAN, A.; DAVIS, R. L. Memory Suppressor Genes: Modulating Acquisition, Consolidation, and Forgetting. **Neuron**, v. 109, n. 20, p. 3211, 10 out. 2021.
- OZAWA, T.; JOHANSEN, J. P. **Learning rules for aversive associative memory formation**Current Opinion in NeurobiologyElsevier Ltd, , 1 abr. 2018.
- PITTIG, A. Incentive-based extinction of safety behaviors: Positive outcomes competing with aversive outcomes trigger fear-opposite action to prevent protection from fear extinction. **Behaviour Research and Therapy**, v. 121, p. 103463, 1 out.

2019.

QUINTANA, D. S. et al. Oxytocin pathway gene networks in the human brain. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019.

RABER, J. et al. **Current understanding of fear learning and memory in humans and animal models and the value of a linguistic approach for analyzing fear learning and memory in humans** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* Elsevier Ltd, , 1 out. 2019.

RESSLER, K. J. Translating Across Circuits and Genetics Toward Progress in Fear- and Anxiety-Related Disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 177, n. 3, p. 214–222, 1 mar. 2020.

REYNOLDS, G.; ASKEW, C. Effects of Vicarious Disgust Learning on the Development of Fear, Disgust, and Attentional Biases in Children. **Emotion**, v. 19, n. 7, p. 1268, 2018.

RIBEIRO, A. M. et al. Sex differences in aversive memory in rats: Possible role of extinction and reactive emotional factors. **Brain and Cognition**, v. 74, n. 2, p. 145–151, 1 nov. 2010.

RIGGENBACH, M. R. et al. Immediate pre-learning stress enhances baseline startle response and fear acquisition in a fear-potentiated startle paradigm. **Behavioural Brain Research**, v. 371, p. 111980, 3 out. 2019.

ROY, D. S. et al. Distinct Neural Circuits for the Formation and Retrieval of Episodic Memories. **Cell**, v. 170, n. 5, p. 1000- 1012.e19, 24 ago. 2017.

SAMUEL, N. et al. **Implicit aversive memory under anaesthesia in animal models: a narrative review** *British Journal of Anaesthesia* Elsevier Ltd, , 1 jul. 2018.

SCHACTER, D. L. Implicit Memory, Constructive Memory, and Imagining the Future: A Career Perspective. **Perspectives on Psychological Science**, v. 14, n. 2, p. 256–272, 1 mar. 2019.

SCHULTZ, C.; ENGELHARDT, M. Anatomy of the hippocampal formation. **Frontiers of neurology and neuroscience**, v. 34, p. 6–17, 23 abr. 2014.

SCOFIELD, M. D. et al. The Nucleus Accumbens: Mechanisms of Addiction across Drug Classes Reflect the Importance of Glutamate Homeostasis. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 3, p. 816, 1 jul. 2016.

SEKERES, M. J.; WINOCUR, G.; MOSCOVITCH, M. **The hippocampus and related neocortical structures in memory transformation** *Neuroscience Letters* Elsevier Ireland Ltd, , 27 jul. 2018.

SHEPPARD, P. A. S. et al. **Rapid actions of oestrogens and their receptors on memory acquisition and consolidation in females** *Journal of Neuroendocrinology* Blackwell Publishing Ltd, , 1 fev. 2018.

SILVA, R. H.; FRUSSA-FILHO, R. The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory–anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 102, n. 2, p. 117–125, 30 out. 2000.

SIMON, E. et al. Challenging anxious cognitions or accepting them? Exploring the

efficacy of the cognitive elements of cognitive behaviour therapy and acceptance and commitment therapy in the reduction of children's fear of the dark. **International Journal of Psychology**, v. 55, n. 1, p. 90–97, 1 fev. 2020.

SOUZA, M. F. et al. Motor, memory, and anxiety-like behavioral impairments associated with brain-derived neurotrophic factor and dopaminergic imbalance after inhalational exposure to deltamethrin. **Brain Research Bulletin**, v. 181, p. 55–64, 1 abr. 2022.

SPATARO, P. et al. **Implicit memory in schizophrenia: A meta-analysis** *Comprehensive Psychiatry* W.B. Saunders, , 1 ago. 2016.

SUE CARTER, C. et al. Is Oxytocin “Nature’s Medicine”? **Pharmacological reviews**, v. 72, n. 4, p. 829–861, 1 out. 2020.

THOMPSON, J. M.; NEUGEBAUER, V. Amygdala Plasticity and Pain. **Pain Research & Management**, v. 2017, 2017.

THOMPSON, J. M.; NEUGEBAUER, V. Cortico-limbic pain mechanisms. **Neuroscience letters**, v. 702, p. 15, 5 maio 2019.

TRIANA-DEL RIO, R. et al. The modulation of emotional and social behaviors by oxytocin signaling in limbic network. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 15, p. 572, 17 nov. 2018.

TWARKOWSKI, H. et al. A dentate gyrus-CA3 inhibitory circuit promotes evolution of hippocampal-cortical ensembles during memory consolidation. **eLife**, v. 11, 1 fev. 2022.

VAIDYANATHAN, R.; HAMMOCK, E. A. D. Oxytocin receptor dynamics in the brain across development and species. **Developmental neurobiology**, v. 77, n. 2, p. 143–157, 1 fev. 2017.

VARGAS, L. DA S.; LIMA, K. R.; MELLO-CARPES, P. B. Infralimbic and prelimbic prefrontal cortex activation is necessary to the enhancement of aversive memory extinction promoted by reactivation. **Brain Research**, v. 1770, p. 147630, 1 nov. 2021.

VOSS, J. L. et al. **A Closer Look at the Hippocampus and Memory** *Trends in Cognitive Sciences* Elsevier Ltd, , 1 ago. 2017.

VOULO, M. E.; PARSONS, R. G. Gonadal Hormone Fluctuations Do Not Affect the Expression or Extinction of Fear-Potentiated Startle in Female Rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 133, n. 5, p. 517, 2019.

WAHIS, J. et al. Astrocytes mediate the effect of oxytocin in the central amygdala on neuronal activity and affective states in rodents. **Nature Neuroscience** 2021 24:4, v. 24, n. 4, p. 529–541, 15 fev. 2021.

WANG, J.; BARBAS, H. Specificity of Primate Amygdalar Pathways to Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 47, p. 10019, 11 nov. 2018.

YAMAGISHI, A.; LEE, J.; SATO, N. Oxytocin in the anterior cingulate cortex is involved in helping behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 393, p. 112790, 1 set. 2020.

YAMAMOTO, Y.; HIGASHIDA, H. RAGE regulates oxytocin transport into the brain.

Communications Biology, v. 3, n. 1, 1 dez. 2020.

YAMASUE, H.; DOMES, G. Oxytocin and autism spectrum disorders. In: **Current Topics in Behavioral Neurosciences**. [s.l.] Springer Verlag, 2018. v. 35p. 449–465.

YANG, Y.; MERRILL, E. C. Implicit memory of locations and identities: A developmental study. **Journal of Experimental Child Psychology**, v. 167, p. 162–179, 1 mar. 2018.

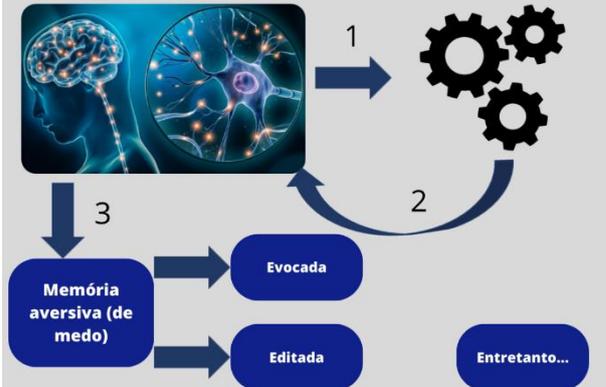
ZHANG, R. et al. Genes Related to Oxytocin and Arginine-Vasopressin Pathways: Associations with Autism Spectrum Disorders. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 238, 1 abr. 2017.

ZHANG, S. et al. Reversal of reserpine-induced depression and cognitive disorder in zebrafish by sertraline and Traditional Chinese Medicine (TCM). **Behavioral and brain functions : BBF**, v. 14, n. 1, p. 13, 14 jun. 2018a.

ZHANG, Z. et al. METTL3-mediated N⁶-methyladenosine mRNA modification enhances long-term memory consolidation. **Cell Research**, v. 28, n. 11, p. 1050–1061, 1 nov. 2018b.

ZHOU, L. et al. Oxytocin Differentially Affects Sucrose Taking and Seeking in Male and Female Rats. **Behavioural brain research**, v. 283, p. 184, 4 abr. 2015.

APÊNDICES

 <p>SE LIGA NA PESQUISA</p> <p>PESQUISA DE DOUTORADO</p> 	<p>PROCFIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS</p> <p>SE LIGA NA PESQUISA</p> <p>Título do trabalho:</p> <p>Influência da injeção de ocitocina, no hipocampo, durante a formação, consolidação e evocação de uma memória aversiva em ratas</p> <p>Discente: João Eduardo Conceição Melo Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos Coorientadora: Profa. Dra. Katty Anne Amador de Lucena Medeiros</p> <p>http://www.posgraduacao.ufs.br/procfis</p>
<p>INTRODUÇÃO</p> <p>O estudo acerca da memória, possibilitou melhor compreender os mecanismos envolvidos na formação desta, além de promover a busca de diferentes formas de agir sobre essas memórias aversivas modulando-as.</p>  <p>http://www.posgraduacao.ufs.br/procfis</p>	<p>INTRODUÇÃO</p> <p>Quando o medo passa a ser exacerbado, o mesmo apesar de ser um mecanismo de defesa estando estando envolvido com a resposta de luta ou fuga, passa a ser patológico.</p> <p>FUGA ou LUTA</p>  <p>Por esse motivo a ciência busca entender como a resposta ao medo funciona, objetivando melhor tratar os indivíduos acometidos com psicopatologias.</p> <p>Atualmente as duas principais abordagens utilizadas no tratamento do medo patológico que são...</p> <p>http://www.posgraduacao.ufs.br/procfis</p>

MATERIAIS e MÉTODOS	RESULTADOS
<p>Os animais passaram por avaliações comportamentais que avaliaram alterações da memória em 3 situações diferentes:</p> <p>Quando receberam ocitocina ANTES da avaliação comportamental na etapa de TREINO</p> <p>Quando receberam ocitocina APÓS a avaliação comportamental na etapa de TREINO</p> <p>Quando receberam ocitocina ANTES da avaliação comportamental na etapa de TESTE</p> <p>http://www.posgraduacao.ufs.br/procfis</p>	<p>A ocitocina ANTES da avaliação na etapa de TREINO</p> <p>Verificamos que os animais diminuíram o medo, passando mais tempo no local que apresentava uma situação estressora, além de passar mais tempo para entender a situação como .</p> <p>A ocitocina APÓS a avaliação na etapa de TREINO</p> <p>Verificamos que na fase de teste, os animais no teste passaram mais tempo no local que apresentava (no treino) a situação aversiva, nos indicando que a memória aversiva não foi armazenada.</p> <p>A ocitocina ANTES da avaliação na etapa de TESTE</p> <p>Verificamos que os animais não se recordam da experiência estressora no treino e passam mais tempo onde existia o estímulo aversivo no teste.</p> <p>http://www.posgraduacao.ufs.br/procfis</p>



UNIVERSIDADE
FEDERAL DE
SERGIPE

PROCFIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



LaNCE

CONCLUSÃO

Com o presente estudo, concluímos que a ocitocina foi capaz de causar alterações comportamentais envolvidas com a memória, causando perda na performance da aprendizagem da memória aversiva, bem como prejuízos na aquisição, consolidação e evocação desta memória e maior enfrentamento de situações aversivas. Além disso, vimos ainda que a ocitocina não foi capaz de alterar o comportamento tipo ansioso, nem motor dos animais.

<http://www.posgraduacao.ufs.br/procfis>

ANEXOS

CARTA DE ACEITE DO PROJETO



Universidade
Federal de
Sergipe

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência da modulação ocitocinérgica no hipocampo de ratas, em diferentes fases do ciclo estral, na formação, consolidação e evocação de memória aversiva", protocolada sob o CEUA nº 4737270122 (10 000602), sob a responsabilidade de **José Ronaldo dos Santos** e equipe; *João Eduardo Conceição Melo; Heitor Franco Santos; Thiago Henrique Almeida Souza; Edson Rezende Santos* - 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 de Sergipe (CEUA/UFS) na reunião de 31/10/2022.

We certify that the proposal "Influence of oxytocinergic modulation in the hippocampus of female rats, at different stages of the estrous cycle, on the acquisition, consolidation and evocation of aversive memory", utilizing 144 Heterogenics rats (144 females), protocol number CEUA 4737270122 (10 000602), under the responsibility of **José Ronaldo dos Santos and team**; *João Eduardo Conceição Melo; Heitor Franco Santos; Thiago Henrique Almeida Souza; Edson Rezende Santos* - 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 Sergipe (CEUA/UFS) in the meeting of 10/31/2022.

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

Vigência da Proposta: de **11/2022** a **06/2024** Área: **Fisiologia**

Origem: **Biotério da Universidade Federal de Sergipe**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **6 a 9 meses**

N: **144**

Linhagem: **Wista**

Peso: **200 a 300 g**

Local do experimento: Os animais estarão alocados no Laboratório de Neurofisiologia (LNFS) durante realização dos experimentos, sendo o biotério de apoio o Biotério setorial, ambos localizados no departamento de fisiologia.

São Cristóvão, 03 de janeiro de 2023

Prof. Dr. Josemar Sena Batista
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe