

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-graduação em Neurociências

ANA PAULA CRESTANI

**Diminuição da aversividade mediante
apresentação de estímulo distrator
durante a reativação da memória**

Porto Alegre
2014

ANA PAULA CRESTANI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt

Porto Alegre
2014

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos melhores pais, os meus;
os quais sempre me deram apoio incondicional.
Obrigada.

AGRADECIMENTOS

Por onde começar? Por quem começar? É difícil.

Com certeza foram muitas as pessoas e as situações que me deram força para seguir durante a realização desse trabalho. Se a vida me perguntasse do que eu gosto, com certeza responderia: uma vida com emoções. Emoções estas que foram responsáveis por consolidar muitas memórias, emoções estas que foram responsáveis por meu amadurecimento como pessoa, que com certeza foram responsáveis pelos inúmeros momentos de felicidade e de perseverança. O que eu levo mais fortemente desse mestrado são os aprendizados de vida, antes de tudo. Aprendi, ou melhor dizendo, aprendemos muito! Por que sei que nessa história eu não estava sozinha, não é Joha, Queru, Rossana, Marina e Bruna? Um dos primeiros ensinamentos é que apesar de uma pequena parcela da população brasileira possuir uma pós-graduação *stricto sensu*, uma parcela infinitamente menor o faz por merecer. Eu tenho certeza em dizer que sim, nós o fizemos por merecer. Não foi por um título, foi por amor a pesquisa. Pesquisa esta que é feita com muitas dificuldades, afinal, só para constar, quem imaginaria que a cepa de ratos ia ser trocada no meio do mestrado? (temos que rir para não chorar!).

... Nessas horas eu já me perdi em pensamentos...

Mas, vamos falar das coisas boas. Eu saio dizendo orgulhosamente que tenho uma turma de mestrado, todos nós que entramos em 2012 somos muito próximos e com certeza fizemos grandes amizades. Sei que entre nós não existe um espírito maligno e competitivo, ao contrário de outros lugares.

Eu posso dizer, sem sombra de dúvidas, que estou no Programa de Pós-Graduação onde as pessoas são mais humanas e altruístas, e nisso entram nossos grandes orientadores (os de papel e os de vida).

Não posso deixar de falar em especial de duas pessoas. O meu pai e o meu irmão na ciência, respectivamente. Em primeiro lugar, o Prof. Jorge, uma das pessoas que eu mais estimo e que sou extremamente grata pela confiança. Uma pessoa que me conquistou pelo seu carisma e pela sua sabedoria, com o qual estou trabalhando desde meu primeiro semestre de graduação; agora já completaram 5 anos e meio. E, o Lucas, que foi a primeira pessoa a me deixar fazer um experimento sozinha, a primeira pessoa

a me instigar a fazer pesquisa, a pessoa com a qual posso chegar e conversar qualquer hora. Obrigada aos dois, vocês não imaginam o quanto eu admiro vocês.

E, o laboratório? Agradeço imensamente ao tão estimulante ambiente de trabalho e aos estimados colegas que proporcionaram isso: Josué, Lindsey, Fabi, Rodri, Johanna, Querusche, Flávia, Fabrício, Luíza, e os que chegaram a pouco tempo. Sem esquecer, é claro, da querida Dona Zelma.

Não posso deixar de agradecer também aos meus amigos de fora da neuro: Liana, Ivi, Charles e Dani(s).

E, para finalizar, a minha família, meu tudo.

Meu maravilhoso pai e minha maravilhosa mãe, que com certeza são as pessoas que eu mais amo nesse mundo; espero tê-los comigo eternamente.

Meus irmãos, Paulo e Carol, que tornam meus dias mais alegres, mesmo estando distante. Meus avós, tios, primos, que são pessoas muito especiais. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

E, por último, não posso deixar de agradecer a UFRGS, ao CNPq, a SBNeC e a IBRO, por fomentos e enriquecimento científico proporcionados.

EPÍGRAFE

Cinco sentidos; um intelecto incuravelmente abstrato; uma memória seletiva totalmente casual; um conjunto de pré-concepções e premissas tão numerosas que eu nunca poderei examinar senão uma minoria delas – nunca sequer torna-me-ei consciente de todas. Quanto da realidade total pode um tal aparato deixar passar?

C. S. Lewis

Nada é mais fatal para o progresso da mente humana do que achar que nossas visões da ciência são definitivas, que nossos triunfos são completos, que não há mistérios na natureza, e que não há mundos novos a conquistar.

Humphry Davy

Há muita coisa que a ciência não compreende, muitos mistérios que ainda devem ser resolvidos.

...

A ciência está longe de ser um instrumento perfeito de conhecimento. É apenas o melhor que temos.

...

(Apesar disso,) Toda vez que um artigo científico apresenta alguns dados, eles vêm acompanhados por uma margem de erro – um lembrete silencioso, mais insistente, de que nenhum conhecimento é completo ou perfeito. É uma calibração de nosso grau de confiança naquilo que pensamos conhecer. Se as margens são pequenas, a acuidade de nosso conhecimento empírico é elevada; se são grandes, é também enorme a incerteza de nosso conhecimento.

Carl Sagan

RESUMO

Uma memória previamente consolidada pode novamente tornar-se lábil através da reativação (desestabilização), necessitando da reconsolidação para se restabilizar e persistir. Quando a memória se encontra no estado lábil ela é suscetível a interferências ou modificações. Portanto, a reconsolidação abre a possibilidade de alterar memórias de medo indesejáveis. Neste trabalho, foi utilizado um novo desenho experimental, onde os animais condicionados a um contexto aversivo eram distraídos, com um sopro suave de ar, quando apresentavam respostas de medo durante a reexposição ao contexto condicionado. Foi observado que um estímulo distrator apresentado durante o estado lábil da memória é capaz de diminuir a aversividade da mesma. A atenuação da memória aversiva foi duradoura já que os animais não demonstraram retorno do medo em teste realizados até 20 dias após o treino. Além disso, foi demonstrado que o estímulo distrator só é efetivo se a memória for previamente desestabilizada. Quando a desestabilização não ocorre, seja devido da exposição a um contexto novo ou ao bloqueio farmacológico da desestabilização, o estímulo distrator não é efetivo em reduzir a memória aversiva. Adicionalmente, foi demonstrado que quando o estímulo distrator é apresentado no período de consolidação, a memória também é prejudicada. Juntos, esses resultados demonstram que a reexposição sob distração pode ser uma estratégia não-farmacológica eficaz no tratamento de memórias aversivas.

ABSTRACT

Memories when reactivated enter a transient, labile state, which is followed by a re-stabilization process termed reconsolidation. During labile state memories are sensitive to interferences. Thus, reconsolidation provides an opportunity to change an unwanted fear memory. In this study, we describe a novel behavioral design in which contextual fear conditioned animals were distracted, with a soft air puff, when expressed freezing response during memory reactivation. Our results showed that distractor stimulus was able to disrupt fear memory when presented during labile state and this disruption was lasting to 20 days after training. Furthermore, it was demonstrated that distractor stimulus effectiveness is dependent of memory destabilization. If animals are exposed in a novel context or destabilization is pharmacologically blocked the distractor stimulus is not effective. Additionally, memory consolidation was disrupted by distraction. Taken together, these results showed that distraction disrupted memory reconsolidation being an effective non pharmacologic strategy to impair fear memories.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BLA – da sigla em inglês para Amígdala Basolateral (*Basolateral Amygdala*)
- CAC – Condicionamento Aversivo Contextual
- CaMKII – da sigla em inglês para Proteína Cinase Dependente de Cálcio / Calmodulina do tipo IIc (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II)
- CB1 – Receptor Canabinóide do tipo 1
- EEG – Eletroencefalograma
- EMDR – da sigla em inglês para Dessensibilização e Reprocessamento por Movimentos Oculares (Eye Movement Dessensitization and Reprocessing)
- HPC – Hipocampo
- I.M. – intramuscular
- I.P. – intraperitoneal
- L-VGCCs – da sigla em inglês para Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem (*Voltage-Gated Calcium Channels*) do tipo L
- NF – κ B – da sigla em inglês para Fator de Transcrição Nuclear do kappa B
- NMDA – N-Metil-D-Aspartato
- S.C. – subcutânea
- TCC – Terapia Cognitivo Comportamental
- TEPT – Transtorno do Estresse Pós-Traumático
- TR – Terapia do Reprocessamento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. MEMÓRIA.....	12
1.1.1. DEFINIÇÃO DE MEMÓRIA.....	12
1.1.2. CLASSIFICAÇÃO DAS MEMÓRIAS.....	13
1.1.2.1. <i>Classificação das memórias quanto a duração</i>	14
1.1.2.2. <i>Classificação das memórias com base no conteúdo</i>	14
1.1.3. ESTRUTURAS RELACIONADAS À FORMAÇÃO DE MEMÓRIAS.....	15
1.1.4. CONSOLIDAÇÃO.....	16
1.1.5. CONSOLIDAÇÃO versus RECONSOLIDAÇÃO.....	21
1.1.6. RECONSOLIDAÇÃO.....	17
1.1.6.1. <i>Mecanismos moleculares de desestabilização das memórias</i>	18
1.1.6.2. <i>Condições de contorno</i>	19
1.1.6.3. <i>Possíveis funções biológicas da reconsolidação</i>	20
1.1.6.4. <i>Reconsolidação em humanos</i>	21
1.1.7. EXTINÇÃO.....	22
1.1.8. RECONSOLIDAÇÃO versus EXTINÇÃO.....	23
1.1.8.1. <i>Estratégias de combate à memórias traumáticas</i>	24
1.2. TERAPIAS.....	25
1.2.1. TERAPIA DA DESSENSIBILIZAÇÃO E REPROCESSAMENTO POR MOVIMENTOS OCULARES (EMDR – <i>Eye Movement Desensitization and Reprocessing</i>).....	25
1.2.1.1. <i>História do desenvolvimento da terapia</i>	25
1.2.1.2. <i>Procedimentos envolvidos na terapia</i>	27
1.2.1.3. <i>Hipóteses de como a terapia EMDR funciona</i>	27
1.2.1.4. <i>Eficácia terapêutica do EMDR</i>	32
2. HIPÓTESE GERAL DE TRABALHO.....	33
3. OBJETIVOS GERAIS.....	33
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4. METODOLOGIA.....	35
4.1. ANIMAIS.....	35
4.2. FÁRMACOS UTILIZADOS.....	35
4.3. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	36
4.4. PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS.....	38
4.4.1. Condicionamento Aversivo Contextual (CAC):.....	38
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4.6. CONSIDERAÇÕES BIOÉTICAS.....	39
5. RESULTADOS.....	41

5.2.1. Reativação sob distração leva a uma diminuição duradoura na aversividade da memória	41
5.2.2. Memória não é prejudicada se a distração é realizada durante a exposição em um contexto novo	43
5.2.3. A diminuição da memória de medo, causada pelo estímulo distrator, é dependente da desestabilização da memória mediada pelos canais de Ca^{2++} dependentes de voltagem do tipo L.....	44
5.2.4. A diminuição da memória de medo, causada pelo estímulo distrator, é dependente da desestabilização da memória mediada pelos receptores NMDA que contém a subunidade <i>GluN2B</i>	46
5.2.5. Uma maior ativação dos receptores NMDA não facilita o efeito do estímulo distrator	47
5.2.6. A distração também interfere com o processo de consolidação da memória.....	48
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. MEMÓRIA

Dentre todas as funções exercidas pelo encéfalo a mais deslumbrante é a capacidade de reter informações. É graças a essa capacidade, e às informações genótípicas, que podemos nos considerar indivíduos únicos. É a memória que garante nossa individualidade e personalidade, é através dela que cada experiência modifica de alguma forma nosso comportamento, de maneira que nossas decisões sempre são influenciadas pelos acontecimentos anteriores.

1.1.1. DEFINIÇÃO DE MEMÓRIA

“Não existe tempo sem um conceito de memória; não há presente sem um conceito do tempo; não há realidade sem memória e sem uma noção de presente, passado e futuro. Memória são as ruínas de Roma e as ruínas de nosso passado; memória temos nós, o sistema imunológico, um computador. Memória é nosso senso histórico e nosso senso de identidade pessoal. Há algo em comum entre todas essas memórias: a conservação do passado através de imagens ou representações que podem ser evocadas. Representações, mas não realidades. Quando se diz a palavra memória, a primeira informação que salta à evocação não é a memória dos discos ou dos computadores; é a memória das experiências individuais dos homens e dos animais, aquela que de alguma maneira se armazena no encéfalo.

Desde um ponto de vista prático, a memória dos homens e dos animais é o armazenamento de informação adquirida através de experiências; a aquisição de memórias denomina-se aprendizado. Como disse Aristóteles, 2500 anos atrás: "Nada há no intelecto que não tenha estado antes nos sentidos". As memórias são fruto do que alguma vez percebemos ou sentimos. A memória ainda não pode ser mensurada de maneira direta, sendo as modificações comportamentais utilizadas como medida mnemônica. O aprendizado e a memória são propriedades básicas do sistema nervoso; não existe atividade nervosa que não inclua ou não seja afetada de alguma forma pelo aprendizado e pela memória. Aprendemos a caminhar, estudar, fazer atos-motores ou ideativos simples e complexos, etc.; e nossa vida depende de que nos lembremos de tudo isso” (Izquierdo 1989)(Izquierdo 1988).

1.1.2. CLASSIFICAÇÃO DAS MEMÓRIAS

Devido à complexidade e a dificuldade de interpretar os fenômenos mnemônicos, costuma-se dividir a memória em fases, e classificá-la de acordo com o *tempo que duram* e de acordo com seu *conteúdo* (Quillfeldt 2010; Izquierdo 2011)

As duas grandes fases são: formação e evocação, podendo ser subdivididas.

A formação da memória incluiria: a aquisição, período que se dá durante a exposição à experiência; e a consolidação, período em que a memória encontra-se relativamente instável e, portanto, sujeita a modificações (McGaugh 1966; Dudai 2004).

A evocação corresponde ao processo que nos permite avaliar a memória. Nos animais ela é observada de duas maneiras: pela *supressão de um comportamento inato*, como deixar de explorar um ambiente devido a um estímulo encontrado nesse ambiente – demonstrando resposta comportamental de medo (*freezing* ou congelamento) ou *aquisição de um comportamento não natural*, como acionar uma alavanca diversas vezes mediante estímulos apetitivos (Izquierdo 2009; Izquierdo 2011).

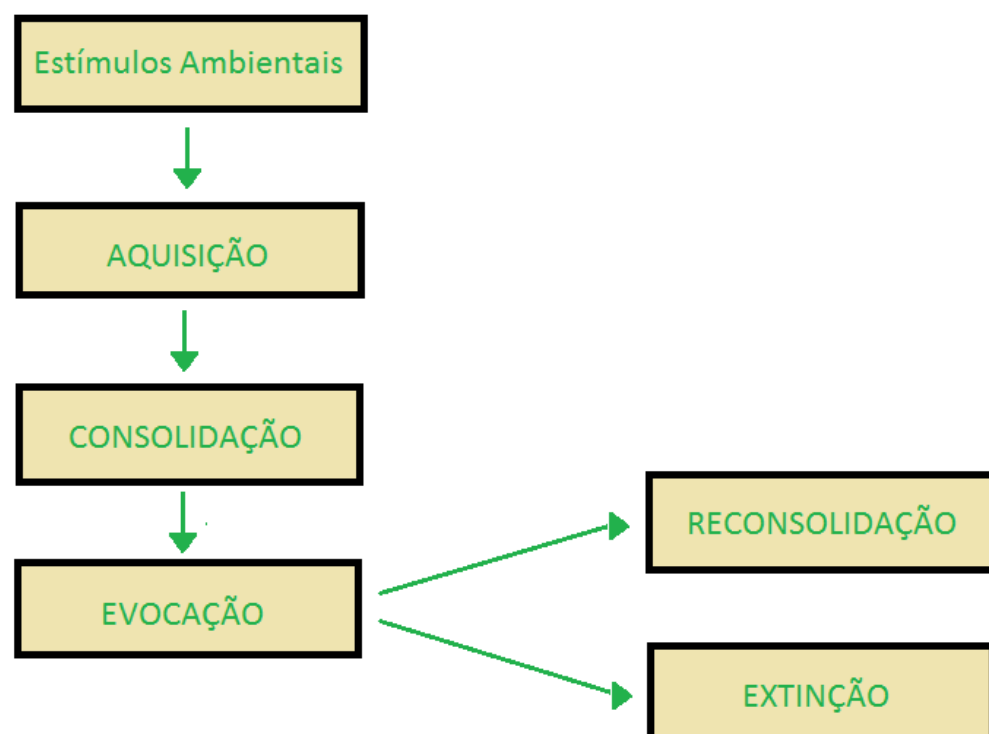


Figura 1. Fases da memória.

Durante a *evocação* dois processos antagônicos podem ocorrer: a *reconsolidação* e a *extinção* (Suzuki et al. 2004). Com a *reconsolidação* a memória se torna lábil novamente e pode ser fortalecida ou alterada (Nader & Hardt 2009). Já com a *extinção*, uma nova memória (com significado distinto) é formada e se sobrepõe à primeira (Milad & Quirk 2002; Bouton et al. 2005).

1.1.2.1. Classificação das memórias quanto a duração

Dependo da duração, uma memória pode receber diferentes denominações. O tempo de duração varia de segundos a anos, ou ainda, décadas (Izquierdo 2009; Izquierdo 2011).

As *memórias de curta duração*, são aquelas que duram entre uma e seis horas, justamente o tempo necessário para que as memórias de longa duração se consolidem. As memórias de curta duração requerem as mesmas estruturas nervosas que a de longa duração, mas envolve mecanismos próprios e distintos (Izquierdo et al. 2002).

As *memórias de longa duração* levam um tempo para serem consolidadas, sendo um dos motivos da demora a necessidade de síntese proteica. Nas primeiras horas essas memórias são lábeis e suscetíveis à interferências, sendo que após uma janela temporal de cerca de seis horas elas se estabilizam, se consolidam (Lechner et al. 1999; McGaugh 2000).

Por último, as memórias de longa duração que duram muitos meses ou anos costumam ser denominadas *memórias remotas* (Izquierdo 2009; Izquierdo 2011).

Ainda podem fazer parte dessa classificação as *memórias de trabalho*, que são memórias momentâneas, que duram de segundos a minutos, necessárias para o gerenciamento da realidade (Baddeley 2003).

1.1.2.2. Classificação das memórias com base no conteúdo

As memórias adquiridas sem a percepção do processo denominam-se *implícitas* ou *de procedimentos* (andar de bicicleta, entre outras habilidades motoras e sensoriais e hábitos; algumas memórias semânticas, como a língua materna). As memórias adquiridas com plena intervenção da consciência se chamam *explícitas* ou *declarativas* (Izquierdo 2009; Izquierdo 2011).

As memórias que registram fatos, eventos ou conhecimento se chamam *declarativas*, porque nós, seres humanos, podemos declarar que existem e podemos relatar como as adquirimos. Entre elas, as referentes a eventos aos quais assistimos ou dos quais participamos denominam-se *episódicas* ou *autobiográficas*; as de conhecimento gerais, *semânticas* (Izquierdo 2009; Izquierdo 2011).

Nos animais quando avaliamos *memórias explícitas*, não podemos dizer que são declarativas, porque esse termo refere-se a habilidade de relatar o evento. A tarefa utilizada nesse trabalho foi o condicionamento aversivo contextual, que forma nos animais uma memória dita *contextual* com caráter aversivo.

1.1.3. ESTRUTURAS RELACIONADAS À FORMAÇÃO DE MEMÓRIAS

“Historicamente, experimentos de aprendizado e memória usavam algumas tarefas associadas a tratamentos amnésicos. Os resultados de uma tarefa eram generalizados para outras, e prevalecia a noção que a memória era regida pelos mesmos princípios independentemente da natureza do estímulo apresentado ou do comportamento que o animal era submetido. Com o passar do tempo emergiu a ideia de que os sistemas de memória funcionam mais independentemente um do outro, cada um controlando diferentes tipos de conhecimentos e respostas. Atualmente, está bem estabelecido que procedimentos específicos são utilizados para estudar sistemas encefálicos específicos e, conseqüentemente, tipos específicos de aprendizado e memória. Como exemplos, pode-se citar o condicionamento aversivo ao som como uma tarefa dependente principalmente da amígdala, o labirinto aquático e o condicionamento aversivo contextual mais dependentes do hipocampo, o condicionamento do piscar de olhos mais dependente do cerebelo” (Nader & Hardt 2009).



Figura 2. Corte sagital medial do encéfalo de *Ratus norvegicus* adulto corado pela técnica de Nissl, sendo a região destacada o hipocampo. Fonte: <http://brainmaps.org/ajax-viewer.php?datid=107&sname=n16c>

1.1.4. CONSOLIDAÇÃO

O termo *consolidação* foi proposto em 1900 (Lechner et al. 1999; McGaugh 2000) e tem sido bastante utilizado desde então. “Evidências do processo de consolidação vêm de diversas demonstrações onde as memórias são sensíveis a alterações durante um determinado período pós-aquisição. Em primeiro lugar, a evocação de memórias pode ser diminuída por tratamentos amnésicos, como choque eletroconvulsivo ou inibidores de síntese proteica, ou ainda por novos aprendizados. Em segundo, a retenção pode ser aumentada por certos compostos como a estriçnina” (Nader & Hardt 2009). Isso implica que a memória existe em dois estados: um *estado lábil*, que é sensível ao *fortalecimento* ou *enfraquecimento*; e, um estado *estável*, em que a memória é insensível a esses tratamentos, e, por definição, é denominada consolidada. É bem sabido que o processo de consolidação é dependente de síntese *de novo* de mRNA, síntese proteica e envolve mudanças estruturais a nível sináptico (Nader & Hardt 2009; Kandel 2002).

É importante notar que o termo *consolidada* significa que a memória é insensível a tratamentos amnésicos, mas isso não implica que todas as mudanças celulares e moleculares induzidas pelo aprendizado estejam terminadas. De fato, as mudanças podem nunca alcançar o término: elas podem continuar por toda a existência dessa memória (Nader & Hardt 2009).

1.1.5. RECONSOLIDAÇÃO

O termo *reconsolidação* foi introduzido em 1973 por Spear e, apesar do termo sugerir, a reconsolidação não seria uma recapitulação exata do processo de consolidação original. O fenômeno já fora detectado em 1968 (Misanin et al. 1968), mas somente em fins dos anos 1990 foi reconhecido e começou a ser citado na literatura (Nader et al. 2000; Przybylski & Sara, 1997).

O primeiro experimento para avaliar o processo de reconsolidação em animais, foi desenhado levando em consideração o tempo de consolidação da memória na tarefa de condicionamento aversivo ao tom; após a memória já estar estabilizada e imune a agente amnésicos, os animais foram novamente expostos ao tom e, em seguida, infundidos com inibidor de síntese proteica, sendo observado, em um teste posterior, déficit de evocação da memória de longa duração. Muitos experimentos semelhantes a esse descrito, em diversas tarefas comportamentais e diferentes espécies animais (Besnard et al. 2012; Hardt et al. 2010), demonstraram que as memórias após serem consolidadas podem novamente entrar, temporariamente, num estado *instável* / *lábil*, através de sua reativação. Além das evidências da reconsolidação a nível comportamental, existem também evidências em nível eletrofisiológico (Fonseca et al. 2006; Doyère et al. 2007), demonstrando esse período de instabilidade da memória após sua reativação.

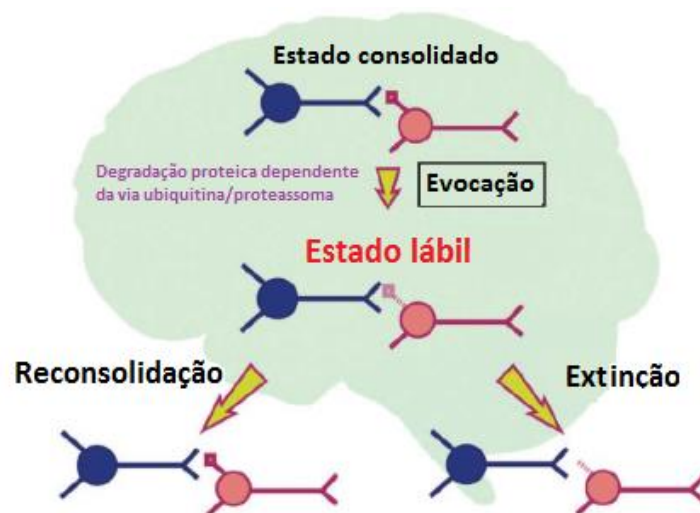


Figura 3. Modelo da desestabilização da memória após a evocação. Quando uma memória é evocada, as sinapses que codificam esse traço de memória podem tornar-se lábeis e dois processos distintos podem ser desencadeados: reconsolidação e extinção da memória. Adaptada de Kaang 2009.

Apesar de todas as evidências, da mesma forma que a consolidação, a reconsolidação também não pode ser considerada uma propriedade universal da memória; isso porque, assim como nem todas as informações são consolidadas em uma memória de longa duração, nem todas as memórias são desestabilizadas, isso somente acontecesse se as condições necessárias são atendidas (Hardt et al. 2010; Nader & Hardt 2009).

Atualmente, existe um crescimento exponencial das publicações com palavras-chaves “memory” AND “reconsolidation” (busca no PubMed em 29 de Janeiro de 2014) com um total de 592 publicações, sendo a maioria publicada nos últimos anos, demonstrando o grande interesse da comunidade científica nesse assunto.

1.1.5.1. Mecanismos moleculares de desestabilização das memórias

Ben Mamou *et al.* (2006) utilizaram um procedimento que permitiu dissociar a desestabilização do processo de restabilização, que ocorrem durante a reconsolidação da memória. Foi demonstrado que a desestabilização da memória é prevenida pela infusão do antagonista seletivo da subunidade GluN2B do receptor NMDA. Dessa forma, um inibidor de síntese proteica (anisomicina) não foi capaz de prejudicar a retenção dessa memória, já que sua desestabilização havia sido bloqueada, através da infusão do antagonista GluN2B na amígdala basolateral (BLA) imediatamente após a reativação. Isso sugere que os receptores NMDA contendo a subunidade GluN2B são necessários para que ocorra o processo de desestabilização da memória, e, conseqüentemente, para que essa memória seja sensível a inibidores de síntese proteica. Subunidades GluN2B são particularmente importantes porque elas possibilitam maior entrada de cálcio (Ben Mamou *et al.* 2006). E memórias resistentes à desestabilização exibem uma subsensibilização (*downregulation*) dos receptores NMDA que contém a subunidade GluN2B (Wang *et al.* 2009). Também é importante ressaltar que a infusão de agonista NMDA, D-cicloserina, facilita a reconsolidação de memórias aversivas e apetitivas (Lee *et al.* 2006).

Outros importantes mecanismos de desestabilização foram identificados. Suzuki *et al.* (2008) demonstraram que os canais de cálcio dependentes de voltagem do

tipo L (L-VGCCs) e os receptores endocanabinóides do tipo 1 (CB1) são requeridos no hipocampo para desestabilizar uma memória de condicionamento aversivo ao medo; o antagonista L-VGCCs utilizado foi a nimodipina (Suzuki et al. 2008).

Tanto NMDARs quanto L-VGCCs podem permitir a entrada de cálcio, que pode agir como segundo mensageiro para ativar diversos processos de plasticidade. Por exemplo, cálcio pode ativar calmodulina e proteína cinase dependente de cálcio / calmodulina do tipo II (CaMKII) que pode induzir a translocação do proteossoma para a densidade pós-sináptica e dar início a degradação de proteínas, fenômeno necessário para a desestabilização da memória (Bingol et al. 2010). Essa ideia é reforçada pelos trabalhos que demonstram que a degradação proteica via ubiquitina-proteossoma é necessária para que ocorra o processo de desestabilização da memória no hipocampo e na amígdala (Kaang et al. 2009). Já foi sugerido que a degradação proteica é um mecanismo *downstream* da ativação dos receptores NMDA que contém a subunidade GluN2B. Além disso, evidências indicam que a proteína fosfatase 2B (PP2B ou calcineurina) também é necessária para que a memória retorne ao estado lábil (Fuente et al. 2011; Shaw et al. 2012).

Os achados relatados nessa sessão revelam que mecanismos distintos podem ser requeridos para iniciar o processo de reconsolidação da memória. Apesar de não estar claro como esses sistemas podem interagir, talvez o influxo de cálcio via GluN2B e L-VGCCs pode ativar a calcineurina e a CaMKII, que via ubiquitina-proteossoma, possibilitam a desestabilização da memória (Finnie & Nader 2012).

1.1.5.2. Condições limitantes

A indução do processo de reconsolidação é dependente de alguns parâmetros, são as chamadas *condições limitantes* (do inglês: *boundary conditions*), que podem ser fisiológicas, ambientais ou psicológicas (Nader & Hardt 2009; Suzuki et al. 2004).

Existem muitas condições limitantes que podem fazer com a reconsolidação ocorra ou não. Elas incluem características da sessão de aprendizado, da sessão de reativação e interações entre as duas (Nader & Hardt 2009).

As características de uma memória consolidada, que parecem impedir a reconsolidação, incluem a *idade* da memória e a *força* do treino. Já, durante a sessão de

reativação, características que podem atuar como *condições limitantes* são, por exemplo, o *tempo da sessão* de reativação e a *similaridade* ou *discrepância* com a memória original (Finnie & Nader 2012; Besnard 2012). A *discrepância* (*mis-match*) entre a memória original e o episódio atual determinam se vai ocorrer ou não a reconsolidação. Um grande grau de similaridade pode não induzir o processo de reconsolidação porque nenhuma informação nova precisa ser codificada, por outro lado, um pequeno grau de similaridade pode ocasionar a formação de um novo traço de memória, mas não desestabilizar o traço anteriormente formado; então, somente um grau de *similaridade* intermediário seria capaz de induzir o processo de desestabilização da memória (Besnard 2012; Osan et al. 2011).

Especificamente, memórias remotas e / ou memórias muito fortes, quando são desestabilizadas, apenas o fazem em sessões de reativação que durem maiores períodos de tempo ou quando são expostas a estímulos novos durante a reativação (Suzuki et al. 2004; Bustos 2009).

1.1.5.3. Possíveis funções biológicas da reconsolidação

Existem, atualmente, *três hipóteses* principais – e complementares - para explicar o funcionamento da reconsolidação, cada qual com seu conjunto de evidências experimentais. A primeira sugere que a reconsolidação esteja relacionada com o *fortalecimento da memória* mediante o reforço do aprendizado original durante a reexposição / reativação (Forcato et al 2011). A segunda sugere que a reconsolidação seja uma oportunidade de *atualização* das memórias, ou seja, de incorporar novas informações ao traço original (Lee 2010). Uma terceira hipótese propõe que a reconsolidação sirva para *manter a precisão* da memória, ou seja, conservar os detalhes ao longo do tempo (de Oliveira Alvares et al. 2013) A hipótese da atualização sugere que essa incorporação de novas informações em uma memória previamente consolidada teria um papel adaptativo ao modificar uma memória e, conseqüentemente, um comportamento (Suárez et al. 2010), sendo estudada com grande interesse em nosso e outros laboratórios.



Figura 4. Funções biológicas da reconsolidação da memória. O processo de reconsolidação é responsável atualizar, fortalecer e/ou manter a precisão da memória. Adaptada do abstract visual de de Oliveira Alvares et al. (2013)

1.1.5.4. Reconsolidação em humanos

Apesar de existirem consideravelmente menos estudos em humanos do que em outros animais, o processo de reconsolidação já foi descrito em diversas tarefas, que incluem: tarefas de habilidades motoras (Walker et al. 2003), memórias episódicas / declarativas (Forcato et al. 2007), condicionamento ao medo (Kindt et al. 2009). Tipicamente, nesses estudos a amnésia pós-reativação é induzida via interferência por um novo aprendizado que compete ou por estresse (Agren 2014; Schiller et al. 2010).

Apesar da grande maioria dos estudos com reconsolidação em modelos não-humanos sugerir que a reconsolidação seja uma estratégia interessante para tratamento de memórias traumáticas em humanos (Hardt et al. 2010; Alberini & Ledoux 2013), poucos estudos (Brunet et al. 2008; Pitman 2011; Poundja et al. 2012) utilizam especificamente a reconsolidação como estratégia terapêutica em pacientes com Transtorno do Estresse Pós-traumático (TEPT).

1.1.6. CONSOLIDAÇÃO versus RECONSOLIDAÇÃO

Durante mais de um século, o paradigma central do estudo da memória foi o da *consolidação* (Lechner et al. 1999; McGaugh 2000). A ideia da imutabilidade das memórias consolidadas tem sido dominante, apesar de evidências contrárias desde os anos 1930, especialmente em estudos psicológicos que sugerem que memórias podem ser reconstruídas quando evocadas, seja alterando-se seu conteúdo ou sua força. Em 1968, com os experimentos de Misanin, esses dois enfoques começaram a se

reconciliar, mas foi apenas a partir de 2000, com o trabalho do grupo de Joseph LeDoux estudando o fenômeno denominado *reconsolidação*, que esse assunto passou a ser finalmente levado a sério (Alberini & Ledoux 2013; Nader & Hardt 2009). Hoje, a reconsolidação é considerada uma das possíveis etapas do processamento mnemônico, e é estudada em muitos laboratórios, incluindo o nosso.

Apesar do termo *reconsolidação* sugerir que seja uma recapitulação exata do processo de consolidação original, atualmente se sabe que existem diversas diferenças entre as fases de consolidação e reconsolidação da memória (Nader & Hardt 2009; Suzuki et al. 2004).

Entre as diferenças podemos citar: a reconsolidação se completa mais rapidamente que a consolidação, suas curvas dose-resposta não são idênticas (Dudai & Eisenberg 2004; Alberini 2005). Quanto aos mecanismos moleculares, a consolidação e a reconsolidação compartilham a ativação de MAPK, PKA e CREB (Alberini 2005), porém existem exceções importantes que diferenciam molecularmente os dois processos (von Herten & Giese 2005; Lee et al. 2012); por exemplo, a proteína BDNF é necessária para a consolidação, mas não para a reconsolidação, enquanto o fator de transcrição Zif268 é recrutado na reconsolidação, mas não na consolidação (Lee et al. 2004).

1.1.7. EXTINÇÃO

A extinção é caracterizada pela formação de uma nova memória (com significado distinto) que se sobrepõem à memória original. Já foi demonstrado também que após a extinção ocorre um enfraquecimento na memória original, sendo esse fenômeno chamado, por alguns autores, de *desaprendizado* (Orsini & Maren 2012)

As propriedades da extinção incluem: *renovação* (ou *renewal* - recuperação de uma performance em um contexto diferente), *restabelecimento* (recuperação de uma performance depois da apresentação apenas do estímulo incondicionado), *recuperação espontânea* (propensão ao retorno da performance com o passar do tempo) e *armazenamento* (ou *saving* - menos apresentações do estímulo incondicionado desencadeiam performance semelhante à observada antes da extinção) (Orsini & Maren 2012).

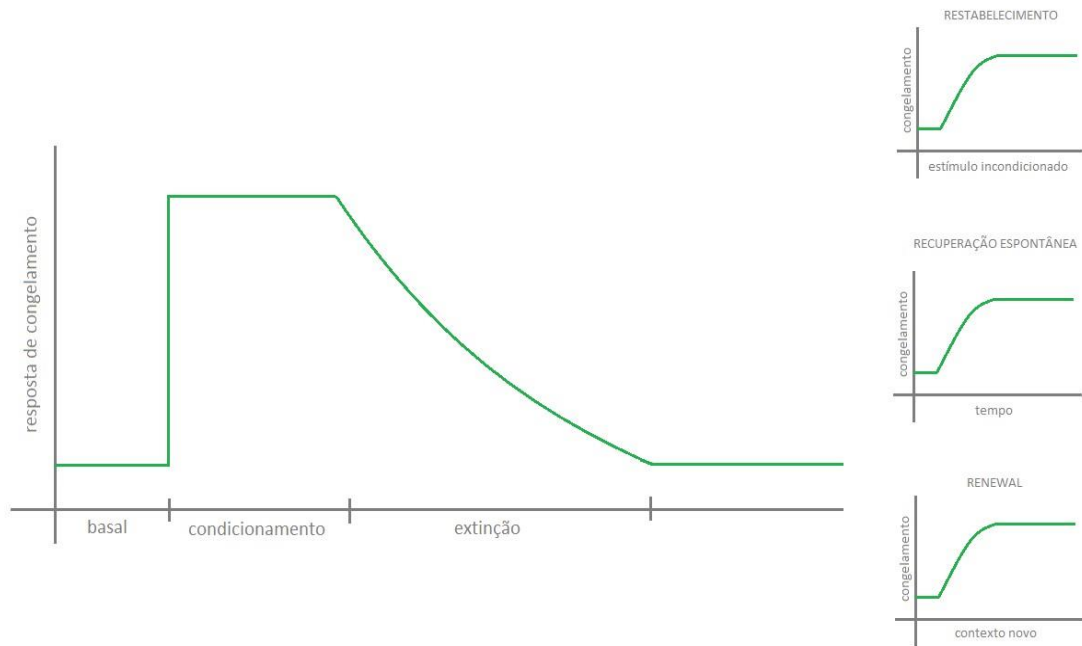


Figura 5. Extinção da memória e suas propriedades: *restabelecimento*, *recuperação espontânea* e *renovação*.

1.1.8. RECONSOLIDAÇÃO *versus* EXTINÇÃO

Independentemente do processo envolvido, parece que a codificação de um novo traço é capaz de evitar a desestabilização do traço da memória que está sendo evocado (Osan et al. 2011; Pedreira et al. 2004; Eisenberg et al. 2003; Suzuki et al. 2004; Pérez-Cuesta & Maldonado 2009). No caso da extinção, o mecanismo da reconsolidação poderia estar envolvido no início da sessão de reativação, e depois de certo tempo passariam a atuar os mecanismos da extinção; isso poderia envolver a supressão do fator de transcrição nuclear do kappa B (NF – κ B), alterações na atividade da calcineurina (de la Fuente et al. 2011) ou ativação de receptores CB1 (de Oliveira Alvares et al. 2008).

Também é possível que os processos intrínsecos a reconsolidação ou a extinção somente iniciem com o término da sessão de reativação, o que poderia induzir mecanismos de plasticidade em assembleias neuronais funcionalmente distintas (Pedreira et al. 2004).

1.1.8.1. Estratégias de combate à memórias traumáticas

Memórias traumáticas são formadas quando o indivíduo é exposto a um evento muito estressante, por exemplo, abuso sexual, catástrofe ou acidente automobilístico. Dentre as pessoas que passam por esses eventos, uma parcela considerável desenvolve o chamado Transtorno do Estresse Pós-traumático (TEPT). Esse transtorno é caracterizado por irritabilidade, hipervigilância, comportamentos de evitação, memórias intrusivas, e, frequentemente, pesadelos e *flashbacks* relacionados com o evento desencadeador. O TEPT afeta 10-20% da população que experimenta um evento traumático (Ehlers & Clark 2000). As estratégias terapêuticas atuais incluem psicoterapia e tratamentos farmacológicos, sendo, porém, efetivas em apenas 60% dos pacientes, com somente 20-30% demonstrando remissão completa (Berger et al 2009).

Sendo assim, uma estratégia terapêutica interessante seria a modificação de uma memória traumática de modo que ela perdesse esse caráter prejudicial.

Como relatado anteriormente, existem poucos estudos em humanos usando a reconsolidação da memória como estratégia terapêutica. O mais interessante dessa estratégia, que já foi utilizada muitas vezes em modelos animais, é que através dela poderíamos interferir comportamentalmente em uma memória traumática, sem utilização de fármacos. Alguns trabalhos demonstraram que é possível interferir em uma memória quando uma extinção é realizada logo após a reconsolidação (Costanzi et al. 2011; Auber et al. 2013), também já foi demonstrado que a realização de uma tarefa comportamental é capaz de interferir consolidação e reconsolidação de outra tarefa (Boccia et al. 2005). Sendo assim, caberia avaliar se, em um modelo animal, seria possível interferir comportamentalmente em uma memória aversiva, de modo que essa memória fosse enfraquecida durante o estágio em que ela se encontra desestabilizada.

Dessa forma, nesse trabalho avaliamos a influência de um estímulo comportamental, o estímulo distrator, na reconsolidação de uma memória aversiva.

Como este trabalho é relevante tanto para pesquisas experimentais na área básica quanto para pesquisas clínicas, na próxima sessão trataremos sobre as psicoterapias no geral, e mais especificamente, a título de curiosidade, abordaremos a terapia que nos fez pensar na possibilidade de interferir comportamentalmente uma memória que se encontra no estado lábil.

1.2. PSICOTERAPIAS

Dentre esses paradigma dominantes existentes na psicologia existem mais de 400 tipos de psicoterapias praticadas, e os esforços para encontrar as mais eficazes, os chamados tratamentos baseados em evidências (EBT – evidenced-based treatments), iniciaram em 1990. Em 2004 *US Departamento for Veterans' Affair and Departament of Defense* publicaram um guia prático para tratamento do TEPT. Quatro abordagens foram identificadas como eficientes em termos de melhora clínica: Terapia Cognitiva, Terapia de Exposição, Treinamento de Inoculação do Estresse e *Terapia da Dessensibilização e Reprocessamento por Movimentos Oculares* (do inglês para *Eye Movement Desensitization and Reprocessing* - EMDR) (Russell 2008). Essas terapias também tem sido reconhecidas pela Associação Americana de Psicologia, de Psiquiatria, Cochrane Review e por meta-análises como os melhores tratamentos baseados em evidências disponíveis para o TEPT (Bisson et al. 2007; Bradley et al. 2005; Etten & Taylor 1998; Maxfield & Hyer 2002).

1.2.1. TERAPIA DA DESSENSIBILIZAÇÃO E REPROCESSAMENTO POR MOVIMENTOS OCULARES (EMDR – *Eye Movement Desensitization and Reprocessing*)

Apesar da terapia EMDR ter-se mostrado efetiva em amenizar sintomas de experiências traumáticas, desde sua criação em 1989, sua legitimidade tem sido questionada e é motivo de amplo debate científico.

A Terapia da Dessensibilização e Reprocessamento por Movimentos Oculares (EMDR) foi desenvolvida por Francine Shapiro, uma psicóloga norte-americana. A própria autora reconhece que apesar da terapia originalmente ter recebido esse nome devido aos movimentos oculares outros estímulos também têm demonstrado serem efetivos, sendo mais adequado chamá-la de **Terapia do Reprocessamento (TR)** (Shapiro 2007). Porém, como a maioria dos estudos continua utilizando a nomenclatura EMDR, manteremos esta sigla.

1.2.1.1. *História do desenvolvimento da terapia*

A utilização inicial dos movimentos oculares não teve como base teoria, nem dados experimentais, mas, sim, uma observação casual feita por Francine Shapiro em

maio de 1987 durante um passeio pelo parque. Ela relata que enquanto caminhava vieram a mente pensamentos perturbadores que foram desaparecendo e se modificando sem que fizesse esforço consciente. Observando o que acontecia, ela percebeu que quando esses pensamentos vinham à mente, os olhos começavam espontaneamente a mover-se. Após isso, Shapiro começou a se concentrar numa variedade de memórias perturbadoras e concomitantemente fazia movimentos oculares, observando que assim as memórias pareciam perder sua carga negativa. Depois, experimentou isso com cerca de 70 voluntários com queixas não-patológicas, pedindo-lhes que seguissem seus dedos com os olhos enquanto movimentava as mãos de um lado para o outro, observando que a eficiência em reduzir as perturbações variava conforme variavam alguns parâmetros (p.ex. velocidade e tempo dos movimentos). Após essas observações, Shapiro desenvolveu um protocolo para utilizar em uma população com diagnóstico clínico de *Transtorno do Estresse Pós-Traumático* (TEPT), com o objetivo de melhorar os sintomas dos pacientes ([Shapiro 2007](#)).

O primeiro estudo clínico controlado foi realizado em 1987. Nesse estudo, os indivíduos diagnosticados com TEPT foram divididos no grupo “placebo”, que descrevia em detalhes sua memória traumática, e o grupo tratado. Ambos os grupos relatavam o evento traumático, atribuindo o nível de ansiedade relacionada; os indivíduos também deviam verbalizar um pensamento positivo que gostariam de ter a respeito de si mesmos e, em seguida, atribuíam um valor relacionado a crença que isso poderia acontecer; os movimentos oculares eram realizados por 15-90min no grupo tratado, enquanto a pessoa pensava nos acontecimentos traumáticos, em diversos momentos da sessão. O tratamento por movimentos oculares mostrou-se efetivo em reduzir a ansiedade e aumentar a auto-confiança, duas características que estão alteradas em pacientes com o transtorno ([Shapiro 1989](#)). Quando esse estudo foi publicado, em 1989, causou uma considerável agitação por que os pacientes, incrivelmente, demonstraram melhora com apenas uma sessão de terapia.

Apesar dessa terapia parecer ter resultados relevantes em alguns casos, percebe-se que sua base teórica não é bem fundamentada, e os mecanismos neurobiológicos envolvidos são, até hoje, simplesmente desconhecidos.

Contudo, EMDR não é a única terapia a ter problemas com hipóteses que suportem o tratamento, a maioria das TCCs também não estão bem esclarecidas, sendo seu mecanismo de ação a questão mais negligenciada nos estudos publicados.

Através dos estudos em ciência básica e clínica pode-se sugerir que as TCCs sejam, em princípio, procedimentos mediados por processos como o de reconsolidação ou o de extinção de memórias.

1.2.1.2. Procedimentos envolvidos na terapia

Na terapia EMDR, os pacientes devem realizar movimentos sacádicos dos olhos enquanto imaginam / recordam o evento traumático. A base teórica dessa terapia parte da constatação de que estímulos externos bilaterais (movimentos no campo visual – que promovem movimentos oculares, além de sensações tácteis e sonoras) são capazes de modificar as memórias traumáticas, diminuindo - não se sabe como - o conteúdo emocional destas.

A psicóloga Francine Shapiro ([Shapiro 2007](#)) acredita que o movimento rápido dos olhos - ou mesmo outro estímulo bilateral - alivia a ansiedade associada com a memória traumática durante sua evocação, permitindo ao paciente reavaliar de maneira positiva o trauma original (o “reprocessamento”) e, assim, tornar sua carga emocional menos negativa (a “dessensibilização”). Os estudos sobre a componente de movimento ocular são, porém, contraditórios e pouco conclusivos, havendo muita inconsistência na literatura ([Etten & Taylor 1998](#); [Bisson et al. 2007](#); [Davidson & Parker 2001](#)).

1.2.1.3. Hipóteses de como a terapia EMDR funciona

Sabemos que eventos relevantes são armazenados com o devido valor emocional e, quando alguém vivencia um evento muito estressante, pode desenvolver TEPT ([Brunet et al. 2008](#)).

Embora o EMDR seja um método terapêutico específico, Shapiro sugere como base neurofisiológica o modelo do *Processamento Acelerado de Informações*. Para ela, uma das maneiras mais simples de descrever os efeitos da terapia é dizer que o evento-alvo manteve-se não-processado, ou ainda, que a memória de tal evento manteve-se

numa *estase* neurobiológica. A hipótese de Shapiro é de que os movimentos oculares (ou estímulos alternativos) utilizados no EMDR desencadeariam um mecanismo fisiológico que ativa o *sistema de processamento de informações* (Solomon & Shapiro 2008).

O *processamento acelerado de informações* permitiria que as informações relacionadas ao trauma fossem adaptativamente resolvidas. Shapiro sugere que o mecanismo de processamento de informações pode ser ativado pelo ato de concentrar-se em outro estímulo (movimentos oculares, prestar atenção em toques alternados com as mãos ou estímulos sonoros). O ato de concentrar-se simultaneamente na memória traumática faria com que o sistema nervoso processasse adequadamente a memória que foi armazenada de forma não-adaptativa (Shapiro 2007).

No *modelo do processamento acelerado de informações*, o alvo é o ponto central associado ao trauma. Quando a Terapia do EMDR é aplicada, pede-se ao paciente para focalizar sua atenção em algo relacionado ao trauma; ou algum aspecto da experiência, tal como uma sensação corporal ou pensamento. Durante a sessão o paciente deve reprocessar todas as informações que estejam associadas a esse ponto central do trauma; acredita-se que o reprocessamento é feito durante cada série de movimentos oculares ou de outros estímulos bilaterais (Shapiro 2007).

Segundo Francine Shapiro, o modelo do processamento acelerado de informações integra os aspectos mais importantes da maioria das modalidades psicológicas. Em sua forma mais simples, o modelo incorporaria as noções fisiológicas de ativação de redes neurais, *contra-condicionamento* e assimilação de informações emocionalmente corretivas e adaptativas (Shapiro 2007).

Embora a exposição constitua um elemento necessário do tratamento com EMDR, ela parece não ser suficiente como única explicação para a rapidez dos efeitos de tratamento obtidos. Sugere-se que os benefícios do *contra-condicionamento* (declarações terapêuticas tranquilizadoras feitas pelo clínico) e da exposição são aumentados quando o paciente “apenas observa” o trauma e a perturbação correspondente (lembrar sem sentir), interferindo com a tendência do paciente de sentir medo; essa interferência poderia ser facilitada pelos próprios movimentos oculares (Shapiro 2007).

Francine Shapiro sugere que os movimentos oculares e os estímulos alternativos contribuiriam para o efeito terapêutico do EMDR ao manter a consciência (externa) do paciente durante o *distress* (interna), ou por ativar funções cerebrais inerentes aos estímulos aplicados no paciente, ou ainda, devido à atenção prestada ao estímulo secundário concomitantemente à lembrança do evento traumático (Shapiro 2007).

Contudo, as teorias que tentam explicar como o EMDR funciona são, até o momento, predominantemente especulativas. Diversas teorias, além das já citadas, têm sido propostas pela própria desenvolvedora da terapia e outros autores, mas até o momento nenhuma foi estudada. Entretanto, a falta de uma explicação definitiva dos mecanismos subjacentes a terapia EMDR de nenhuma forma diminui a eficácia do método, confirmado na prática clínica. Dessa maneira, a compreensão do mecanismo neurobiológico seria importante porque contribuiria para o aperfeiçoamento da metodologia.

Uma das teorias sugere que haveria uma distorção do estereótipo de resposta onde as memórias traumáticas não causariam mais as mesmas respostas fisiológicas (Shapiro 2007). Outra interpretação seria que os movimentos oculares distrairiam o paciente do trauma. Essa presumida distração provocaria o *descondicionamento* devido à incapacidade do paciente em concentrar-se na imagem traumática (Dyck 2003). A distração impediria que o material traumático fosse reforçado pela ansiedade previamente antecipada, constituindo um esforço na direção da extinção (Deville 2001).

Além das várias hipóteses anteriores, também existe a sugestão que os movimentos oculares dirigidos poderiam estar estimulando os mesmos processos que ocorrem no sono REM, tendo sido proposto que a relação entre os movimentos oculares e o estresse poderia ser de inibição recíproca; ou seja, os movimentos oculares ajudariam a inibir o estresse, mas um estresse suficientemente alto também inibiria os movimentos oculares e, conseqüentemente, o reprocessamento dessas memórias traumáticas (Stickgold 2002).

Outra proposta é que os movimentos oculares poderiam causar uma resposta condicionada de relaxamento (Shapiro 2007).

A ativação bilateral também tem sido defendida como necessária para obtenção de efeitos terapêuticos no EMDR. A ativação alternada dos dois hemisférios, devido aos movimentos oculares, induziria um processamento integrativo de informações. O objetivo clínico é o de manter o paciente consciente da memória traumática enquanto é ativado simultaneamente o mecanismo de processamento mantendo a atenção num estímulo apresentado durante evocação da memória traumática (Shapiro 2007).

Outra explicação alternativa é a *teoria da memória de trabalho* (Andrade et al., 1997), que propõe que esses movimentos oculares reduzem a vividez de imagens estressantes ao perturbar o chamado “bloco de anotações visuo-espacial” (*visuospatial sketchpad*, parte da teoria de Alan Baddeley) da memória de trabalho, e, assim, reduziria a intensidade das emoções associadas com as imagens (Baddeley 2003).

A *teoria da memória de trabalho* prediz que para a evocação de uma memória explícita, a memória de trabalho é requerida. Se uma tarefa secundária é executada durante a evocação de uma memória, menos recursos da memória de trabalho estarão disponíveis para evocá-la, ela será efetivamente experimentada com menos vividez e, conseqüentemente, com menor conteúdo emocional. Movimentos oculares são utilizados como tarefa secundária que também requer memória de trabalho, reduzindo a nitidez durante a recuperação da memória e afetando sua posterior evocação. O movimento ocular ‘atrairia’ a memória de trabalho – causando “distração” - justificando muitos resultados experimentais (Andrade et al 1997). Além disso, já foi demonstrado que tarefas secundárias que não requerem a atenção da memória de trabalho, como o simples tamborilar automático dos dedos, não promovem os efeitos benéficos da terapia (van den Hout et al. 2011; van den Hout et al., 2001), enquanto que movimentos mais complexos, que requerem atenção, conseguem causar efeitos significativos (Andrade et al.,1997).

Da mesma forma, efeitos de redução do trauma são observados quando a memória de trabalho é requerida por tarefas secundárias que não movimentam os olhos, como, por exemplo, o *shadowing* auditivo – ouvir distraidamente enquanto caminha (Gunter & Bodner 2008), por exemplo, o desenhar uma figura complexa (Gunter & Bodner, 2008), a realização de cálculos (Engelhard et al. 2011; van den Hout et al. 2011), ou jogar *Tetris* (Engelhard et al. 2010). Nestes estudos, os participantes evocam

uma memória negativa durante a realização de outra atividade (*dual task*), o que causa interferência na memória original (van den Hout et al. 2011).

Além disso, existem várias propostas teóricas, e outras baseadas em estudos de neuroimagem e eletrofisiologia. Podemos classificar os modelos da seguinte forma: 1. Modelo da decodificação (Dyck 1993); 2. Modelo da resposta orientada (Armstrong & Vaughan 1996); 3. Ativação dos Lobos Frontais (Bergmann 2000); 4. Sistemas fisiológicos do tipo *REM-like* (Stickgold 2002) 5. Supressão/Ativação Recíproca do Cingulado Anterior (Kaye 2007); 6. Mapeamento Neural Hipocampal; 7. Estimulação de baixa frequência (Rasolkhani-Kalhorn & Harper 2006); 8. Ligação talâmico-temporal (Bergmann 2008); 9. Ativação do Lobo Parietal (Pearson 2009). Para mais detalhes ver a revisão de (Bergmann 2010).

Como é costume na área da psicologia clínica, muitas hipóteses *ad hoc* são levantadas sem muita evidência direta ou indireta, por vezes apenas devido a uma simples analogia, sendo que poucos se preocupam em substanciar os modelos uma vez que as metodologias funcionem. A série de modelos teóricos e empíricos resenhados por Bergmann (2010) lista diferentes áreas anatômicas em função desta ou daquela propriedade que poderia ser base do que está acontecendo durante um procedimento EMDR, e é possível que mais de uma, ou mesmo todas, estejam corretas até certo ponto, pois não são totalmente excludentes. Contudo, isso dificulta compreender algum “mecanismo” integrador, que seja comum a maioria desses modelos, o que nos leva a processos mais gerais e envolvendo diferentes (no mínimo duas) áreas do SNC (Bergmann 2010).

Dentre todas, o modelo da memória de trabalho e/ou atenção a um estímulo secundário¹ parece ser uma boa hipótese integradora; apesar de essa teoria mencionar estímulos competindo entre si, ela não elabora um modelo com componentes mnemônicos propriamente ditos, de modo que caberia complementá-la e expandi-la sugerindo um mecanismo neurobiológico subjacente à terapia EMDR.

A possibilidade que nos ocorre é que este mecanismo unificador seja basicamente a *reconsolidação da memória*, já que clinicamente o que se observa é a modificação duradoura da memória aversiva original, que fica atenuada; Solomon &

¹ Ao mesmo tempo que a pessoa presta atenção a um estímulo secundário, ela também recruta sua memória de trabalho para executar essa função, por isso os dois são dependentes entre si.

Shapiro recentemente também sugeriu como base neurobiológica da terapia a *reconsolidação da memória* (Solomon & Shapiro 2008). A ideia básica, no conjunto, é que a *reativação na presença de um estímulo distrator* - não necessariamente um alvo móvel “atraindo” o olhar do paciente (a própria Shapiro fala em *EMDR stimulation* como podendo ser visual, auditiva ou tátil) - *pode interferir com a reconsolidação de uma memória aversiva*, que, deste modo, modifica sua valência ou intensidade.

Com esses referenciais, desenvolvemos um desenho experimental controlado, incluindo um estímulo “distrator” não necessariamente visual (e que será externamente aplicado, já que não podemos induzir respostas oculares voluntárias nem à rememoração imaginativa de eventos em animais como ratos. Neste modelo, porém, menos que estudar atenção propriamente dita (que só faremos mediante a infusão de fármacos em regiões envolvidas na função), aferimos as modificações causadas por estímulos distratores durante a sessão de reativação de memórias aversivas (simulando as memórias traumáticas) que leva à desestabilização e consequente reconsolidação da memória em outro estado, por exemplo, menos aversivo.

1.2.1.4. Eficácia terapêutica do EMDR

Como descrito anteriormente, os estudos com EMDR são bastante contraditórios e não se sabe ao certo se os estímulos secundários (movimentos oculares, estímulos táteis ou sonoros) auxiliam de fato na melhora de pacientes com TEPT, e, se auxiliam, de que maneira isso acontece.

Existem diversas meta-análises comparando os efeitos do EMDR com outras terapias. Uma meta-análise feita com estudos realizados em crianças demonstrou que a terapia é mais efetiva que TCC (Rodenburg et al. 2009). Outras meta-análises demonstraram que o EMDR é tão efetivo quanto a terapia de exposição tradicional (Bisson et al. 2007; Bradley et al. 2005), e tão efetivo quanto a TCC (Etten & Taylor 1998; Ho & Lee 2012). Além disso, há uma meta-análise demonstrando que os movimentos oculares não contribuíam para o efeito do EMDR, mas apesar disso eram comparáveis a outras psicoterapias (Davidson PR & Parker KCH, 2001), ao contrário de outra que encontrou que o EMDR com movimentos oculares foi mais efetivo quando comparado ao EMDR sem movimentos oculares (Lee & Cuijpers 2013; Schubert et al.

2011). Há, enfim, muitos estudos controversos na literatura, além de críticas às próprias avaliações meta-analíticas (Deville et al. 2014).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE GERAL DE TRABALHO

Como o EMDR parece ser capaz de, em essência, modificar memórias traumáticas em sua forma e conteúdo, pareceu-nos natural supor que o processo neurobiológico que medeia tais alterações seja o da desestabilização-reconsolidação da memória. Baseado em resultados clínicos onde se observa a redução de memórias traumáticas através da utilização de tarefas duais (evocação da memória traumática concomitante a estímulo visual, sonoro ou tátil), e, em trabalhos experimentais onde é possível modificar a reconsolidação de uma memória aversiva ou não com fármacos, perguntamo-nos se seria possível diminuir a aversividade de uma memória utilizando um estímulo comportamental concomitante (distrator) no período em que esta encontra-se desestabilizada, e se assim, ela poderia ser reconsolidada com um caráter menos aversivo.

Assim sendo, nossa hipótese é a de que a reativação de uma memória aversiva na presença de um estímulo distrator interfere com a reconsolidação da mesma, modificando sua valência ou intensidade.

3. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar se um estímulo distrator durante a sessão de reativação de um Condicionamento Aversivo Contextual em ratos é capaz de prejudicar a reconsolidação de uma memória aversiva, atenuando sua aversividade.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1. Padronizar, na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto (CAC), o tempo de reexposição necessário (3, 5 ou 12 minutos) para que o *estímulo distrator* seja efetivo em reduzir o medo associado ao contexto em um teste sem a presença desse estímulo; após encontrar o(s) tempo(s) necessários para que o estímulo distrator seja

efetivo, verificar se essa diminuição do medo se mantém em um reteste (15 dias após o teste 1).

3.1.2. Avaliar se a desestabilização da memória é dependente do contexto, expondo os animais a um contexto diferente do original.

3.1.3. Verificar se a modificação na memória original é dependente da desestabilização utilizando o bloqueador de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, nimodipina, injetada intraperitonealmente 30 minutos antes da reativação.

3.1.4. Avaliar se o hipocampo é necessário para que ocorra o processo de desestabilização / reconsolidação, infundindo localmente o bloqueador seletivo da subunidade GluN2B do receptor NMDA, ifenprodil, 15 minutos antes da reativação da memória;

3.1.5. Avaliar se um agonista parcial dos receptores NMDA, D-cicloserina, poderia facilitar o efeito do estímulo distrator em uma sessão de reexposição mais curta (3 minutos).

3.1.6. Verificar se o estímulo distrator é capaz de prejudicar a consolidação de uma memória quando apresentado durante uma sessão de reexposição realizada 12 ou 120 minutos após a sessão de treino.

4. METODOLOGIA

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, com idade igual ou superior a 60 dias (pesos entre 250 e 350 g). Os animais foram produzidos no CREAL – Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e mantidos no Ratário do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação dentro do Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, acondicionados em gaiolas de *plexiglass* de dimensões 65 x 25 x 15 cm, em cujo assoalho espalha-se maravalha seca e limpa, trocada a cada dois dias (a maravalha é composta por restos do corte de madeira, principalmente uma serragem grossa e lascas). A área é climatizada (22-26 °C, humidade constante) e submetida a um ciclo artificial de iluminação de 12h claro / 12h escuro (luzes acesas das 6 às 18 h durante todo o ano).

4.2. FÁRMACOS UTILIZADOS

Nos tratamentos feitos durante as reexposições (reativações), visando estudar a desestabilização da memória de medo, foi injetado o bloqueador de canal de cálcio dependente de voltagem do tipo L (*nimodipina*) ou seu veículo, tampão fosfato salina, sempre 30 minutos antes da sessão por via intraperitoneal, na dose de 16mg/Kg e volume de aproximadamente 0,3mL por rato. Para estudar a função do hipocampo, infundimos localmente o antagonista da subunidade GluN2B do receptor NMDA (ifenprodil), 15 minutos antes da sessão de reexposição, na dose de 1mg/kg, com volume de 0,5µL por lado.

A d-cicloserina, agonista parcial dos receptores NMDA, foi injetada intraperitonealmente 30 minutos antes da sessão de reexposição, na dose de 15mg/Kg e volume de aproximadamente 0,3mL por rato.

Como anestésicos utilizamos o anestésico geral, Cloridato Cetamina 10%, ('Cetamin' fabricação Syntec) juntamente com Cloridato de Xilazina 2% ('Xilazin' de fabricação Syntec ou 'Anasedam' de fabricação Vetbrands), administrados intraperitonealmente, nas doses de 75mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente. E como

antibiótico, para prevenir possíveis infecções causadas pela cirurgia foi injetado nos animais Tilosina ("Tyladen", de fabricação Vetbrands) 10 mg/Kg intramuscular, após o animal estar anestesiado.

Cabe ressaltar que não foram utilizados analgésicos no pós-cirúrgico. O motivo disso foi a possível influência do uso destes fármacos no comportamento do animal (devido a manipulação), considerando que este tipo de tratamento deveria ser realizado durante vários dias. Apesar disso, os animais demonstram perfeitas condições pós-cirúrgicas, não aparentando sinais de estresse ou dor.

4.3. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

As coordenadas do hipocampo dorsal foram obtidas, inicialmente, a partir do Atlas de Paxinos e Watson (1986), de acordo com a faixa de peso dos animais utilizados. Como sempre há variações na forma e nas dimensões do crânio e do cérebro de linhagens de ratos criadas em diferentes localidades, ajustamos as coordenadas fornecidas pelo Atlas à realidade de nossos animais. As coordenadas finais (para a posição da ponta da cânula, 1 mm acima do verdadeiro "alvo"), medidas a partir do Bregma, foram as seguintes: antero-posterior (AP)= -0.40mm; látero-lateral (LL)= ± 0.30 mm e DV= -0.16mm.

Neste trabalho, foram fixadas cânulas intracerebrais e, através destas, injetado os fármacos através um tipo de agulha mais fina ("mizzy", de calibre 30), introduzida por dentro da primeira. É importante que a ponta da agulha saia mais à frente da cânula, o que evitava que a droga que saísse pela ponta da "mizzy" por capilaridade, alterando a quantidade efetivamente administrada da substância na estrutura intracerebral. Assim, a ponta da cânula a ser fixada desce até 1 mm acima da posição desejada dentro da estrutura-alvo (hipocampo dorsal), e o milímetro final foi percorrido pela "mizzy" no momento da injeção. Um volume de 0,5µl/lado foi infundido num período prolongado, de 90s, sendo que após a retirada da agulha da cânula, mais 30s foram esperados para que o fármaco se difundisse.

Anestesia: Os animais foram anestesiados com um anestésico geral, Cloridato Cetamina 10%, ('Cetamin' fabricação Syntec) juntamente com Cloridato de Xilazina 2% ('Xilazin' de fabricação Syntec ou 'Anasedam' de fabricação Vetbrands),

administrados intraperitonealmente (I.P.), nas doses de 75mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente.

Pré-operatório: Para reduzir o índice pós-operatório de infecção, os animais receberam, após serem anestesiados (para reduzir o desconforto), a administração de um antibiótico, Tilosina (“Tyladen”, de fabricação Vetbrands) 10 mg/Kg i.m. intramuscular.

Craniotomia e Colocação das Cânulas: Cada animal operado foi cuidadosamente colocado em um Aparelho Estereotáxico (Fabricação: David Kopf, modelo 1404), e a superfície de seu crânio exposta mediante incisão sagital com bisturi Nº 20 ou 21. Uma craniotomia bilateral foi realizada com o emprego de uma broca odontológica nos locais correspondentes às coordenadas AP e LL da estrutura em questão. Uma cânula de aço inoxidável (manufaturada a partir de agulha com diâmetro interno de 0,7 mm, calibre ou gauge 27, e diâmetro interno de 0,3 mm), presa à torre móvel do estereotáxico, foi introduzida cuidadosamente através de cada um desses orifícios feitos na calota craniana e baixada lentamente até a coordenada dorso-ventral (DV) definitiva. A cânula foi, então, fixada nesta posição com acrílico dentário aplicado ainda quando na forma de um líquido espesso, que foi deixado secar e solidificar. O acrílico foi trabalhado para formar uma espécie de "capacete" sobre o osso do crânio, fechando a janela óssea produzida.

Pós-Operatório: No período imediatamente posterior à cirurgia, os animais permaneceram sob aquecimento / umidade controlados, numa câmara pós-operatória. Após decorrido um período mínimo de 5 dias de recuperação pós-operatória, deu-se início aos experimentos comportamentais.

Controle Histológico das Cirurgias: A verificação do acerto da posição da cânula no encéfalo do animal foi realizada em todos os animais que cumpriram as seguintes condições: (a) recuperação integral da cirurgia de implantação das cânulas, (b) conservação do capacete de acrílico até o momento da injeção (ver adiante), e (c) cânulas fixas e desobstruídas no momento da injeção. Após a realização das tarefas comportamentais, os animais foram sacrificados por guilhotinamento e depois infundidos com azul de metileno em cada cânula, no mesmo volume empregado na administração dos fármacos (0,5 µl). A seguir os cérebros foram dissecados e colocados em solução de formaldeído a 10% por 24-72 h. Posteriormente, as peças, já endurecidas, foram cortadas manualmente com uso de bisturi descartável, e as marcas das cânulas no

tecido cerebral foram verificadas sob uma lupa inocular mesoscópica 2-40X (com o auxílio da marcação com azul de metileno).

4.4. PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS

4.4.1. Condicionamento Aversivo Contextual (CAC):

Esta tarefa comportamental foi realizada em uma caixa de dimensões 25cm X 25cm X 25cm. A parede frontal é de vidro, através do qual se observa o animal e as laterais são de madeira. O assoalho é composto de barras de bronze de 1 mm de diâmetro cada, espaçadas 1 cm uma das outras. Nesta grade aplica-se uma diferença de potencial elétrico, obtendo-se, conseqüentemente, uma corrente elétrica de 0,2 a 1,0 mA, conforme desejarmos.

4.4.1.1 Sessão de condicionamento:

No dia 1 os animais foram colocados na caixa de condicionamento. Após 3 minutos eles receberam 2 choques de 0,7mA, com intervalo de 30 segundos entre eles. Os animais foram retirados da caixa e recolocadas em suas caixas-moradia aos 4 minutos.

4.4.1.2 Sessão de reexposição (reativação) da memória:

No dia 3, os animais foram reexpostos por 3, 5 ou 12 minutos (reexposição) na mesma caixa. O grupo controle foi somente reexposto e o grupo distrator foi estimulado com o distrator após um 1 minuto do início da sessão; esse tempo foi dado para que o animal reconheça o contexto e comece a evocar a memória; todas as vezes em que o animal começar a entrar em estado de congelamento (do inglês, freezing) tentamos atrair sua atenção para o *distrator* (sopro suave de ar principalmente na região anterior do corpo) com o objetivo de diminuir a memória de caráter aversivo daquele contexto. Utilizamos o tempo de congelamento exibido pelos animais (resposta de medo), validado por Blanchard e Blanchard (1969) como índice de memória.

As infusões de fármacos intracerebral (i.c.) e subcutânea (s.c.) ou intraperitoneal (i.p.) se deram 15 ou 30 minutos antes da reativação, respectivamente.

4.4.1.3 Sessão de teste:

No dia 5, os animais foram testados por 4 min e foi quantificada a memória, avaliada através do tempo de *freezing*.

4.4.1.4 Sessão de teste II (recuperação espontânea):

Quinze dias após a primeira sessão de teste, os animais foram testados novamente por 4 min para avaliar se a memória recuperou o caráter aversivo.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados paramétricos (percentual de tempo de congelamento) foram expressos como média + erro padrão (E.P.). As comparações entre grupos experimentais foram feitas mediante Análise de Variância de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ou, quando entre dois grupos, pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Para todos os experimentos o valor de *P* foi estabelecido em 0,05.

4.6. CONSIDERAÇÕES BIOÉTIICAS

4.6.1. Manuseio dos animais

Os protocolos de administração de substâncias, bem como a manipulação do animal durante o procedimento, seguiram um guia de técnicas para o trabalho com animais de laboratório. Durante o experimento não existiu procedimento invasivo nenhum adicional aqueles descritos na metodologia. Os choques utilizados para o condicionamento foram de intensidade média (baixa amperagem 0,7mA), de curta duração e sem maiores efeitos físicos quando aplicado.

4.6.2. Decapitação dos animais

Todos os animais foram decapitados, procedimento rápido e indolor, realizado em uma sala diferente daquela em que os experimentos foram realizados.

4.6.4. Manejo das carcaças de animais e demais rejeitos

Todo material biológico – especialmente as carcaças dos animais - foi acondicionado em sacos plásticos brancos fornecidos pela empresa coletora licitada pela Universidade no período em que se realizaram os experimentos, e ficaram armazenados

em freezer horizontal exclusivamente destinado a esse fim, localizado dentro das instalações do Lab. 205 do Departamento de Biofísica, I.B. Seu recolhimento foi realizado regularmente, pelo menos uma vez por semana. Os materiais de plástico com resíduos biológicos não-tóxicos (luvas, tubos de *eppendorf*, ponteiros) foram acondicionados em sacos brancos ao final de cada experimento e armazenados em recipiente adequado, também no Departamento de Biofísica, para posterior recolhimento pelo serviço específico da empresa licitada para esse fim e destinados a um processo de autoclavagem. Procedimento semelhante foi utilizado para os resíduos tóxicos, neste caso, devidamente identificados como “tóxicos”.

4.6.5. Outros aspectos legais e éticos

Cumprindo o que predica a diretriz legal brasileira - Lei nº 11.794/2008, todos os procedimentos experimentais com animais vivos (ratos Wistar albinos) envolveram o mínimo de desconforto ou sofrimento dos animais experimentais, sendo realizados estritamente de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), da International Brain Research Organization (IBRO) e do Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS), e somente tiveram início após a aprovação por parte do Comitê de Ética em Experimentação de nossa instituição (CEUA / UFRGS) - projeto aprovado número 23326. Priorizou-se, sempre que possível, a reavaliação e otimização do desenho experimental, envidando os maiores esforços no sentido de reduzir o número de animais e/ou o número de grupos experimentais.

5. RESULTADOS

5.2.1. Reativação sob distração leva a uma diminuição duradoura na aversividade da memória

Para padronização de um protocolo experimental capaz de ser efetivo em diminuir o medo associado ao contexto através do bloqueio da reconsolidação, os animais foram submetidos a diferentes tempos de reativação. Levando em consideração que o tempo de reexposição é um fator muito importante para causar a desestabilização da memória de medo, após os animais serem treinados, eles foram reexpostos ao contexto durante por 3 min, 5 min ou 12 min. Toda vez que o animal demonstrava respostas de medo, utilizamos como estímulo distrator um *sopro suave de ar (airpuff)* aplicado principalmente próximo as vibrissas e na região mais anterior do corpo do animal. A análise dos resultados por teste *t* de Student demonstrou que, quando comparado ao grupo controle apenas reexposto ao contexto, a reexposição de 3 minutos *sob distração* não foi capaz de reduzir as respostas de medo nem durante a sessão de reativação ($t_{(13)} = 0,229$; $P = 0,823$) nem no teste ($t_{(13)} = 0,565$; $P = 0,582$) (Figura 1, página 42). Entretanto, quando o tempo de reativação foi aumentado para 5 minutos, o estímulo distrator, comparado ao grupo reexposto sem distrator, mostrou-se efetivo na redução das respostas de medo tanto durante a sessão de reexposição ($t_{(21)} = 2,588$; $P = 0,017$) quanto durante a sessão de teste ($t_{(21)} = 2,090$; $P = 0,049$) e de reteste ($t_{(21)} = 2,879$; $P = 0,009$) (Figura 2, página 42). Adicionalmente, teste *t* de Student demonstrou que uma reexposição de 12 minutos sob distração, comparada a reexposição sem distração, foi efetiva em diminuir o medo durante a reexposição ($t_{(11)} = 4,284$; $P = 0,001$), mas essa diferença não se manteve durante o teste ($t_{(11)} = 0,863$; $P = 0,407$) (Figura 3, página 43).

Esses resultados sugerem que a distração durante a sessão de reexposição é efetiva em diminuir as respostas de medo dentro de uma janela temporal que vai de 5 minutos até algum tempo inferior a 12 minutos, e esse efeito mostrou ser duradouro já que no reteste os animais mantiveram os níveis baixos de *freezing*.

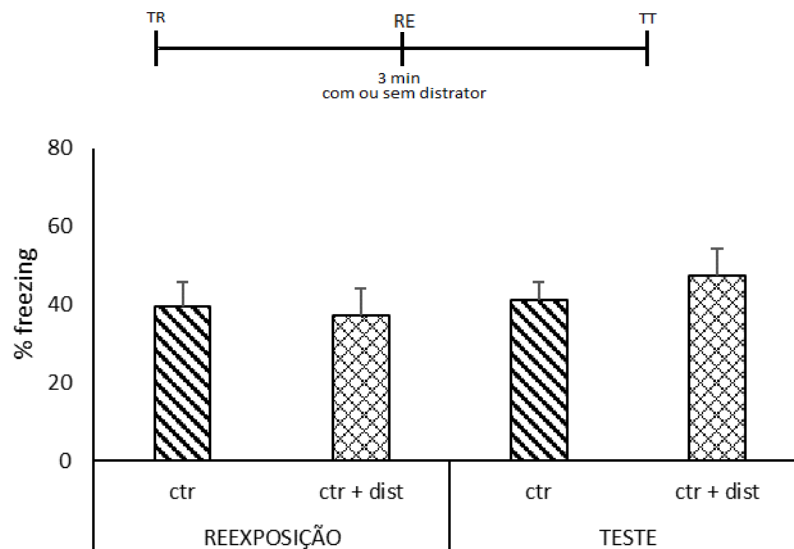


Figura 1. Reexposição no contexto treino durante 3 minutos não é suficiente para que o estímulo distrator seja efetivo em reduzir as respostas de medo durante a sessão de reexposição e durante a sessão de teste. O gráfico mostra a porcentagem de *freezing* durante a sessão de reativação e de teste, expressas como \pm SEM. Ctr= grupo controle (N= 8) e Ctr + dist= grupo controle com distrator (N= 7).

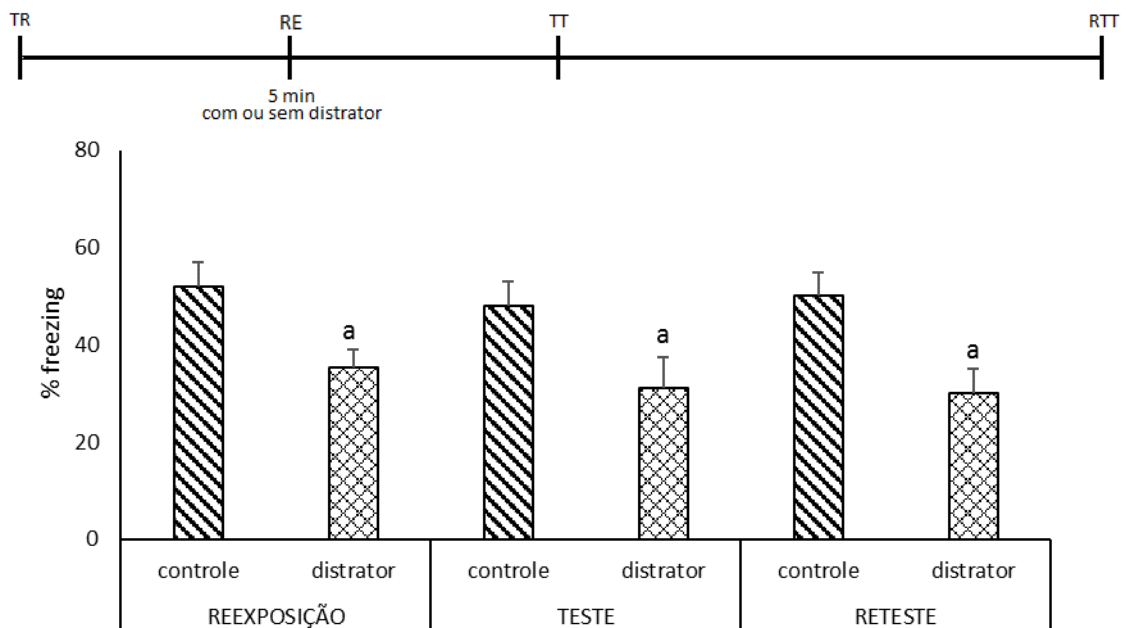


Figura 2. Reexposição no contexto treino durante 5 minutos com sob distração foi *efetivo* em reduzir as respostas durante a sessão de reexposição, durante a sessão de teste e também durante a sessão de reteste. Grupo controle (N= 12) e grupo controle com distrator (N= 11). O gráfico mostra a porcentagem de *freezing* durante a sessão de reativação e de teste, expressas como \pm SEM. (a) diferença significativa $P < 0,05$ em relação ao grupo controle.

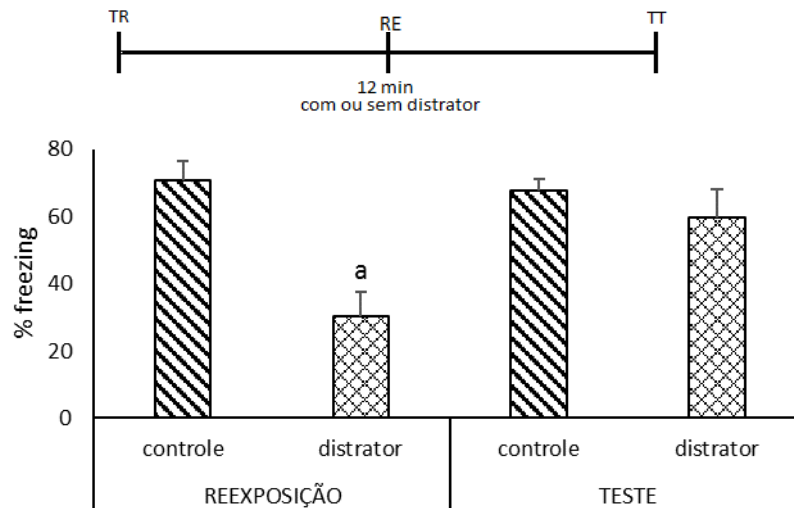


Figura 3. Reexposição no contexto treino durante 12 minutos com sob distração *não* foi efetivo em reduzir as respostas durante a sessão de reexposição nem durante a sessão de teste. O gráfico mostra a porcentagem de *freezing* durante a sessão de reativação e de teste, expressas como \pm SEM. (a) diferença significativa $P < 0,05$. Grupo controle (N= 6) e grupo controle com distrator (N= 7).

5.2.2. A memória não é prejudicada se a distração é realizada durante a exposição em um contexto novo

Para avaliar se a efetividade do estímulo distrator é dependente do contexto onde o animal é exposto, dois grupos de ratos (sob distração e sem distração) foram expostos ao contexto novo, onde a memória não é desestabilizada. Durante a sessão de exposição, teste *t* de Student mostrou que o estímulo distrator não reduziu a expressão do medo, sendo que o grupo sob distração e o grupo sem distração mostraram níveis similares de *freezing* ($t_{(13)} = 1,141$; $P = 0,274$). No teste, teste *t* de Student não mostrou diferença entre os grupos expostos com distração ou sem distração ($t_{(13)} = 0,472$; $P = 0,645$) (Figura 4, página 44). Esses resultados demonstram que o estímulo distrator não é capaz de causar redução do medo quando a exposição é realizada em um contexto muito diferente do original (contexto novo), além disso, esses resultados sugerem que para o distrator ser efetivo a memória deve ser previamente desestabilizada.

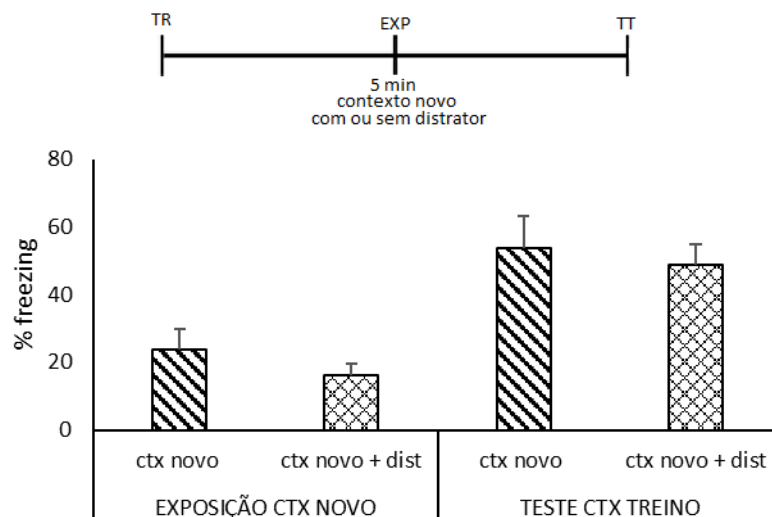


Figura 4. Dependência contextual do estímulo distrator. O estímulo distrator apresentado em um contexto novo não foi capaz de causar diminuição das respostas de medo durante a sessão de exposição ao contexto novo, nem durante o teste. O gráfico mostra a porcentagem de *freezing* durante a sessão de reativação e de teste, expressas como \pm SEM. Ctx novo = contexto novo (N= 7) e Ctx novo + dist = Contexto novo + distrator (N= 8).

5.2.3. A diminuição da memória de medo, causada pelo estímulo distrator, é dependente da desestabilização da memória mediada pelos canais de Ca^{2++} dependentes de voltagem do tipo L

Para verificar se o efeito do estímulo distrator é dependente da desestabilização da memória, foi injetado intraperitonealmente um antagonista dos canais de cálcio dependente de voltagem, a nimodipina, antes da sessão de reexposição. A nimodipina impede a desestabilização durante a evocação de uma memória original, sem afetar a evocação ou o armazenamento dessa memória (Suzuki et al.2004;De Oliveira et al.2013;Flavell et al.2011;Suzuki et al.2008). Se a diminuição da memória de medo causada pelo estímulo distrator é dependente do processo de desestabilização-reconsolidação da memória, então bloqueando a desestabilização da memória poderíamos prevenir o efeito da distração. Durante a sessão de reexposição de 5 min, ANOVA de duas vias mostrou efeito principal da distração ($F_{(1,29)}= 37,447$, $P < 0,001$). Post-hoc de Tukey mostrou que o grupo veículo reativado sob distração demonstrou menores níveis de *freezing* do que o grupo veículo sem distração ($P < 0,001$) e o grupo nimodipina sob distração, quando comparado ao grupo nimodipina com distração, também teve os níveis de *freezing* reduzidos ($P < 0,001$). Esses resultados mostram que o estímulo distrator reduz as respostas de medo durante a sessão de reativação, independente da droga pré-injetada (veículo ou nimodipina) (Figura 5, página 45).

No teste, ANOVA de duas vias mostrou efeito principal da distração (sob distração e sem distração) ($F_{(1,29)} = 7,245$, $P = 0,012$), efeito principal de droga (veículo and nimodipina) ($F_{(1,29)} = 12,174$, $P = 0,002$) e interação (distração x droga): $F_{(1,29)} = 4,299$, $P = 0,047$. Post-hoc de Tukey demonstrou que, comparado com o grupo veículo sem distração, o grupo veículo sob distração teve as respostas de medo diminuídas ($P = 0,002$); contudo, a administração de nimodipina antes da reexposição preveniu o efeito do distrator de diminuir a memória de medo comparado com o grupo nimodipina sem distrator ($P = 0,670$) (Figura 5, página 45).

Esses resultados demonstram que o bloqueio da desestabilização, através do antagonista dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, preveniu o efeito do estímulo distrator, mostrando ser necessária a desestabilização da memória para que o estímulo distrator seja efetivo em reduzir a memória de medo.

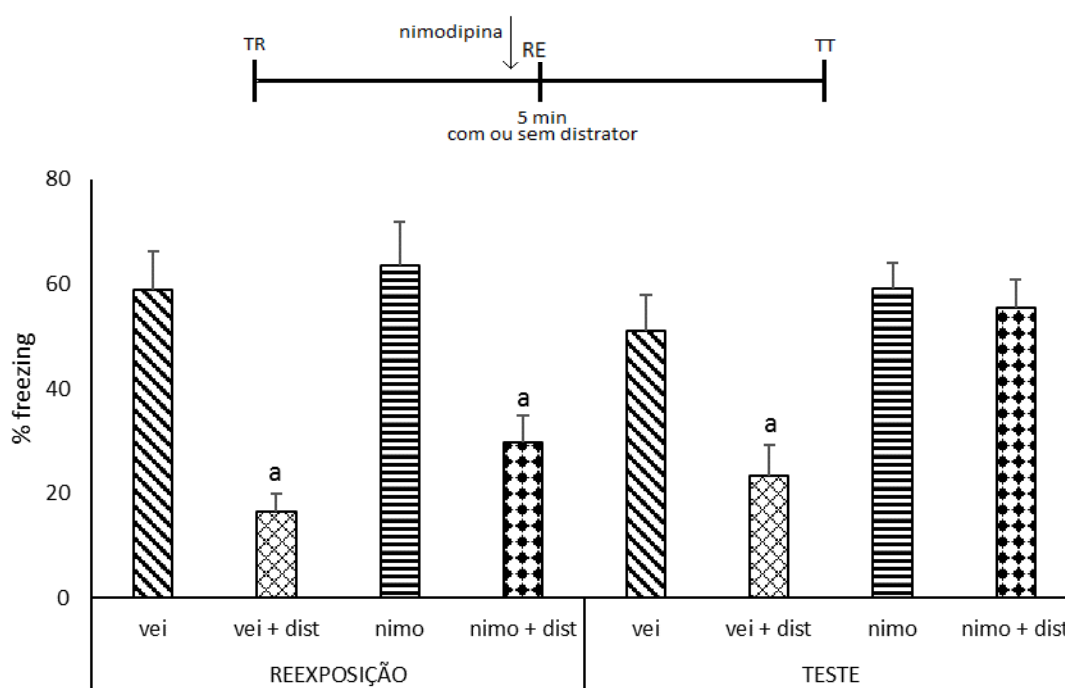


Figura 5. O gráfico mostra a porcentagem de *freezing* durante a sessão de reativação e de teste, expressas como \pm SEM. Injeção de nimodipina subcutânea, 30 minutos antes da sessão de reativação, não influencia na sessão de reativação, mas impede o efeito do distrator em diminuir o conteúdo aversivo da memória durante o teste. O gráfico mostra a porcentagem de *freezing* durante a sessão de reativação e de teste, expressas como \pm SEM. (a) diferença significativa $P < 0,05$. Todas as outras comparações não foram significativas. Veí= veículo (N= 8); veí + dist = veículo com distração (N= 9); nimo = nimodipina (N= 8); nimo + dist = nimodipina com distração (N= 8).

5.2.4. *A diminuição da memória de medo, causada pelo estímulo distrator, é dependente da desestabilização da memória mediada pelos receptores NMDA que contém a subunidade GluN2B*

O hipocampo é uma das principais estruturas encefálicas envolvidas com a reconsolidação de memórias espaciais de medo (Winocur et al., 2009). Estudos prévios demonstraram que receptores NMDA contendo a subunidade GluN2B são essenciais para a desestabilização da memória (Ben et al.2006;Milton et al.2013). Sendo assim, nós infundimos um antagonista seletivo da subunidade GluN2B dos receptores NMDA, o ifenprodil, bilateralmente na região CA1 do hipocampo 15 minutos antes da sessão de reexposição. ANOVA de duas vias demonstrou durante a reexposição efeito principal da distração (sob distração e sem distração) ($F_{(1,42)}= 6,565$, $P= 0,014$); e interação (distração x droga): ($F_{(1,42)}= 5,585$, $P= 0,023$). Post-hoc de Tukey demonstrou que o grupo veículo reativado sob distração teve menores taxas de *freezings* quando comparado com o grupo veículo reativado sem estímulo distrator ($P= 0,002$) e não foi encontrada diferença entre os grupos tratados com ifenprodil (com e sem distrator) ($P= 0,885$) (Figura 6, página 47). Esses resultados demonstram que o distrator reduz a memória de medo durante a sessão de reexposição apenas no grupo veículo.

No teste, ANOVA de duas vias demonstrou efeito principal da distração (sob distração e sem distração) ($F_{(1,42)}= 5,653$, $P = 0,022$) e interação (distração X droga) ($F_{(1,42)}= 7,422$, $p = 0,009$). Post-hoc de Tukey mostrou que o grupo sob distração expressou menores níveis de *freezing* quando comparado ao grupo sem distração ($P= 0,001$); além disso, os grupos infundidos com ifenprodil antes da sessão de reexposição demonstraram respostas semelhantes de medo ($P= 0,802$) (Figura 6, página 47).

Esses resultados indicam que o efeito do estímulo distrator em reduzir as respostas de medo é dependente da desestabilização da memória mediada por receptores NMDA que contém a subunidade GluN2B, se essas subunidades são bloqueadas a memória não pode ser desestabilizada e, conseqüentemente, o estímulo distrator não é efetivo em reduzir as respostas de medo.

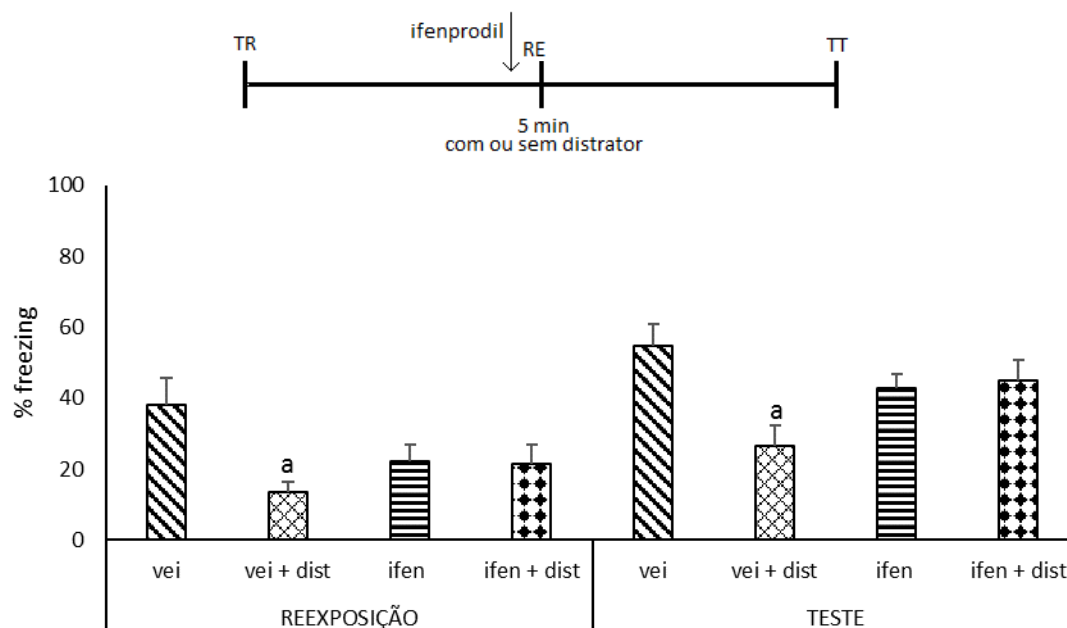


Figura 6. O gráfico mostra a porcentagem de *freezing* durante a sessão de reativação e de teste, expressas como \pm SEM. Infusão intrahipocampal de ifenprodil, 15 minutos antes da sessão de reativação, não influencia na sessão de reativação, mas impede o efeito do distrator em diminuir o conteúdo aversivo da memória durante o teste. O gráfico mostra a porcentagem de *freezing* durante a sessão de reativação e de teste, expressas como \pm SEM. (a) diferença significativa $P < 0,05$. Todas as outras comparações não foram significativas. Vei= veículo (N= 9); vei + dist = veículo com distração (N= 13); ifen = ifenprodil (N= 12); ifen + dist = ifenprodil com distração (N= 12).

5.2.5. Uma maior ativação dos receptores NMDA não facilita o efeito do estímulo distrator

Sabendo que a desestabilização da memória pode ser facilitada pela entrada de cálcio, resolvemos avaliar se um agonista parcial dos receptores NMDA, a d-cicloserina, poderia facilitar o efeito do estímulo distrator, fazendo com que o distrator fosse efetivo em um período de tempo menor (3 min) daquele onde ele não havia sido efetivo (5 min). Como mostrado nos experimentos anteriores, uma reativação de 3 minutos não foi suficiente para que o estímulo distrator fosse efetivo em diminuir a memória de medo, associamos uma reativação de 3 minutos com a administração prévia de d-cicloserina, para verificar se assim o distrator seria efetivo.

Durante a *sessão de reativação*, teste *t* de Student mostrou que o grupo DCS (d-cicloserina) reexposto com estímulo distrator teve as respostas de medo diminuídas durante a sessão de reexposição ($t_{(16)} = 5,845$; $P < 0,001$), porém essa diminuição não se manteve no teste ($t_{(16)} = 0,778$; $P = 0,448$) (Figura 7, página 48).

Esses resultados demonstram que uma reexposição de 3 minutos, mesmo com administração de d-cicloserina, não é suficiente para reduzir as respostas de medo na sessão de teste.

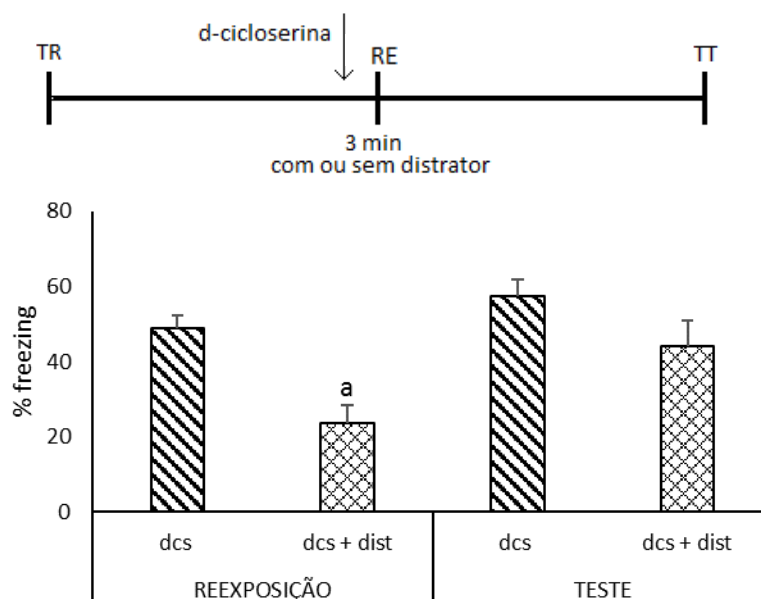


Figura 7. Injeção intraperitoneal de d-cicloserina, agonista parcial dos receptores NMDA, tornou o distrator momentaneamente efetivo durante uma reexposição de 3 minutos, mas esse efeito não se manteve no teste. O gráfico mostra a porcentagem de *freezing* durante a sessão de reativação e de teste, expressas como \pm SEM. (a) diferença significativa $P < 0,05$. Dcs= d-cicloserina, dcs + dist = d-cicloserina com distração.

5.2.6. A distração também interfere com o processo de consolidação da memória

Os mecanismos subjacentes a consolidação e reconsolidação da memória são muito similares. Sendo assim, também foi avaliado se o estímulo distrator seria capaz de prejudicar o processo de consolidação da memória. Para isso os animais foram treinados no CAC e durante o período de consolidação (12 ou 120 minutos após o treino) foram reexpostos no mesmo contexto sob distração ou sem distração.

Quando os animais foram reexpostos 12 minutos após o treino, o distrator foi capaz de causar diminuição da resposta de medo durante a sessão de reexposição (Teste t de Student, $t_{(13)} = 11,334$; $P < 0,001$) e também durante a sessão de teste ($t_{(13)} = 3,075$; $P < 0,009$) (Figura 8, página 49). Por outro lado, quando os animais foram reexpostos 120 minutos depois do treino apesar do estímulo distrator interferir durante a sessão de reexposição (Student t -test ($t_{(13)} = 4,804$; $P < 0,001$), esse efeito não se manteve na sessão de teste ($t_{(13)} = 0,616$; $P = 0,549$) (Figura 9, página 49).

Esses resultados mostram que o estímulo distrator também é efetivo em diminuir a consolidação da memória quando apresentado num breve período após o treino (12 minutos).

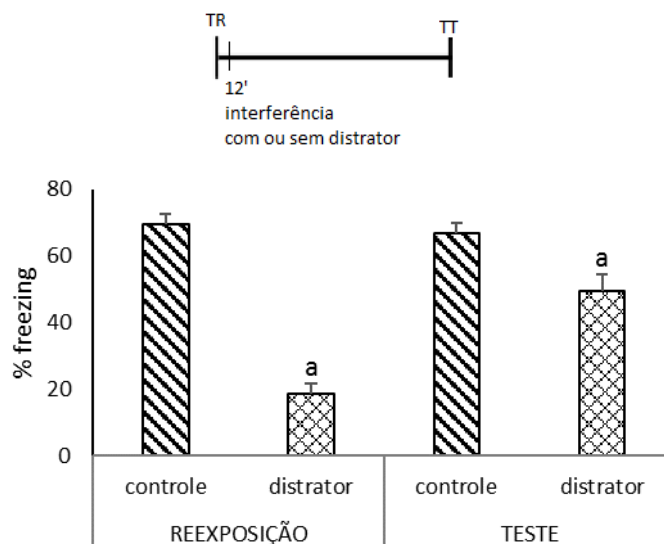


Figura 8. Efeito do estímulo distrator no período de consolidação da memória aversiva contextual. Os animais foram reexpostos 12 minutos após o treino no mesmo contexto onde haviam sido treinados, um grupo foi somente reexposto e outro reexposto com estímulo distrator (interferência). Durante a reexposição o grupo com estímulo distrator teve as respostas de medo diminuídas ($P < 0,05$.) e esse efeito se manteve no teste. Grupo controle (N= 8) e grupo distrator (N= 7) ($P > 0,05$).

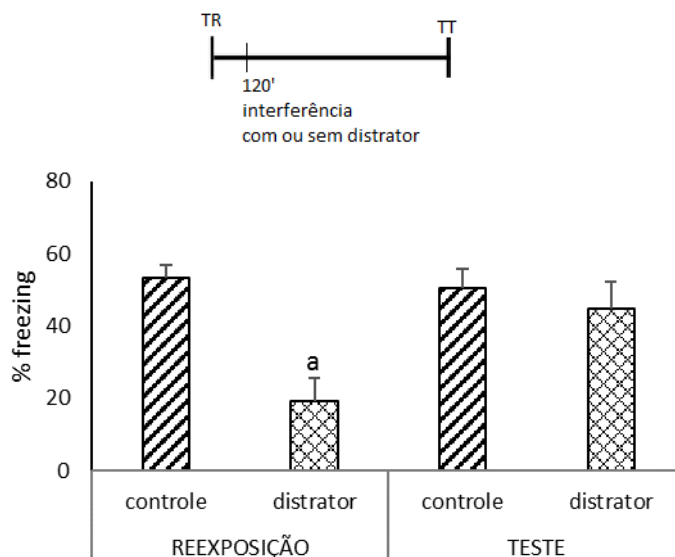


Figura 9. Efeito do estímulo distrator no período de consolidação da memória aversiva contextual. Os animais foram reexpostos 120 minutos após o treino no mesmo contexto onde haviam sido treinados, um grupo foi somente reexposto e outro reexposto com estímulo distrator (interferência). Durante a reexposição o grupo com estímulo distrator teve as respostas de medo diminuídas ($P < 0,05$.) contudo, esse efeito se manteve no teste. Grupo controle (N= 8) e grupo distrator (N= 7).

6. DISCUSSÃO

Com esse estudo observamos que um estímulo distrator apresentado durante a reexposição ao contexto é capaz de diminuir a aversividade da memória. A efetividade do estímulo distrator foi observada com uma reexposição de 5 minutos (Figura 2, página 42), mas não com 3 (Figura 1, página 42) e 12 minutos (Figura 3, página 43). A atenuação da memória aversiva foi duradoura já que os animais não demonstraram retorno do medo em teste realizados até 20 dias após o treino, o que sugere uma modificação dependente do processo de desestabilização-reconsolidação da memória (Figura 2). Também foi demonstrado que o estímulo distrator só é efetivo se a memória for previamente desestabilizada. Quando a desestabilização não ocorre, seja através da reexposição a um contexto novo (Figura 4, página 44) ou através do bloqueio da desestabilização pela utilização de fármacos (Figura 5 e 6, páginas 45 e 47), o estímulo distrator não é efetivo em reduzir a aversividade da memória. Além disso, o estímulo distrator também se mostrou efetivo em prejudicar a consolidação de uma memória de medo (Figura 8 e 9, página 49).

Trabalhos anteriores tem demonstrado que a reexposição de um animal ao contexto onde havia sido treinado, na ausência do estímulo incondicionado, pode causar não apenas a evocação, mas também a reativação / desestabilização dessa memória. Aparentemente é essa pequena *discrepância (mis-match)* entre a memória original e o episódio corrente que determina se vai ocorrer ou não uma reconsolidação com modificação do traço mnemônico. Quando as memórias se encontram no estado ativo elas são suscetíveis a interferências tanto endógenas (estado motivacional, sede, fome) (Cocoz et al 2011; Delorenzi & Frenkel, 2005; Sierra et al., 2013) quanto exógenas (fármacos) (Gamache et al. 2012; Nader et al. 2000). Essas interferências podem tanto enfraquecer quanto fortalecer o traço de memória original, que depois será reconsolidado de uma maneira modificada / atualizada.

Nos primeiros experimentos realizados nesse estudo (Figuras 1, 2 e 3, páginas 42 e 43) foi demonstrado que a sessão de reexposição de 5 minutos sob distração foi capaz de diminuir a memória de medo verificada no teste. Esses resultados sugerem que o estímulo distrator foi capaz de causar modificações na memória original através de um processo de *reconsolidação*, de modo que essa memória passou a ser duradouramente menos aversiva.

Além disso, esses primeiros resultados demonstraram que a distração durante a sessão de reexposição é efetiva em diminuir as respostas de medo dentro de uma janela temporal específica, que vai de 5 minutos até algum tempo inferior a 12 minutos, sendo que a janela temporal assemelha-se a uma curva em U invertido, onde tempos muito curtos não são suficientes para causar a diminuição do medo, bem como tempos longos também não são (Suzuki et al. 2008; Bustos 2009). Talvez, a exposição de 3 minutos não seja longa o suficiente para que o animal modifique a associação contexto-choque previamente consolidada. Por outro lado, a reexposição de 12 minutos pode dar início a formação de uma memória de extinção, o que poderia justificar a ausência de efeito do estímulo distrator, já que dessa forma estaria sendo formada uma nova memória (de extinção) e não estaria sendo modificada a memória original.

Esse resultado pode ser relacionado com resultados clínicos onde ocorre a atenuação de memórias traumáticas através da utilização de tarefas duais (*dual-tasks*), nas quais se utilizam estímulos secundários capazes de reduzir o medo associado a determinadas memórias; como se observam melhoras duradouras, pode-se sugerir que terapias baseadas na realização de tarefas duais (bem como, a terapia EMDR) estejam modificando, possivelmente de forma permanente, memórias traumáticas através do processo de reconsolidação da memória. Bem como existem estudos mostrando que novas tarefas interferem com a formação de memórias (Boccia et al. 2005).

A existência de determinadas *condições limitantes* específicas para que se dê o processo de desestabilização da memória, foi demonstrada experimentalmente. Entre condições *limitantes* importantes temos o *tempo de reexposição* e as *dicas contextuais*. O trabalho de Suzuki et al. (2004), por exemplo, demonstrou que diferentes tempos de exposição são necessários para desestabilizar memórias de diferentes idades, sendo memórias mais antigas mais resistentes ao processo. Já as dicas contextuais necessárias para que ocorra o processo de desestabilização-reconsolidação ou, por outro lado, de formação de uma nova memória de extinção, dependem do grau de similaridade entre o contexto onde os animais foram treinados e onde serão reativados. Besnard et al. (2012) sugere que contextos com grande grau de similaridade podem não induzir o processo de reconsolidação porque nenhuma informação nova precisa ser codificada; por outro lado, um pequeno grau de similaridade pode ocasionar a formação de um novo traço de memória (com a consequente extinção do traço original, neste caso), mas não desestabilizar o traço anteriormente formado; desta forma, somente um grau de

similaridade intermediário entre estes extremos seria capaz de induzir um real processo de desestabilização da memória (Osan et al. 2011; Besnard 2012). Baseados nisso, expusemos os animais a um contexto diferente daquele onde eles haviam sido treinados, de modo que o grau de diferença fosse suficientemente grande para que não causasse a desestabilização da memória; fizemos isso para avaliar se o efeito do estímulo distrator em diminuir a aversividade da memória dependia das condições de contorno – no caso a exposição ao mesmo contexto em que o aprendizado se deu. O experimento 4 (Figura 4, página 44) mostrou que o distrator só é efetivo em diminuir a aversividade da memória no contexto adequado, sugerindo que depende da desestabilização da memória para agregar-se ao traço. Isso corrobora resultados que demonstram a influência de fármacos apenas em situações em que a memória se encontra lábil (Nader, 2000; Suzuki, 2004).

Diversos mecanismos moleculares são necessários para iniciar a desestabilização das memórias e fazer com que elas entrem no estado lábil. Entre esses mecanismos temos a entrada de cálcio mediada pelos receptores NMDA que contém a subunidade GluN2B e os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-VGCC). O trabalho de Ben Mamou et al. (2006) demonstrou elegantemente que usando um inibidor seletivo aos receptores NMDA que contém a subunidade GluN2B (ifenprodil) a desestabilização da memória é bloqueada e, conseqüentemente, um inibidor de síntese proteica infundido logo após a sessão de reexposição não consegue prejudicar o processo de reconsolidação dessa memória. Da mesma forma, outros trabalhos demonstraram que o bloqueio dos receptores L-VGCC impedem a desestabilização da memória (De Oliveira Alvares et al. 2013; Suzuki et al. 2008). Os receptores que permitem a entrada de cálcio parecem ser importantes para que diversas cascatas moleculares sejam desencadeadas dentro dos neurônios, já que o íon cálcio atua como segundo mensageiro. Por exemplo, o cálcio ativa a proteína cinase dependente de cálcio calmodulina do tipo II, que atua induzindo a ativação e translocação do proteassoma na densidade pós-sináptica, sendo importante para a degradação proteica, o que possivelmente está envolvido com a desestabilização da memória (Bingol et al. 2010; Lee et al. 2008; Kaang et al. 2009).

Nesse trabalho, administramos dois antagonistas, um seletivo aos receptores L-VGCC – a nimodipina – e o outro ao receptor NMDA, mais propriamente àqueles que contém a subunidade GluN2B- o ifenprodil - para verificar os mecanismos moleculares envolvidos nessa modificação de traço de memória com atenuação do medo são, de fato, mediados pelo processo de reconsolidação. Tanto a injeção sistêmica de

nimodipina (Figura 6, página 47), quanto a infusão intrahipocampal de ifenprodil (Figura 7, página 48), antes da sessão de reexposição impediram que o estímulo distrator diminuísse a aversividade da memória no teste.

Como pode-se observar na Figura 7 (página 48), durante a sessão de reexposição, o grupo infundido com *ifenprodil sem distrator* não diferiu do grupo infundido com *ifenprodil + distrator* (que seria o resultado esperado), além disso o grupo *ifenprodil sem distrator* demonstrou menos *freezing* do que o grupo *veículo sem distrator*. Como a infusão do fármaco é antes da sessão de reexposição, isso pode ter influenciado nas respostas de medo durante a sessão de reexposição, fazendo com que os animais desse grupo congelassem menos do que o esperado. Mas, pode-se observar na mesma figura durante o teste, que o grupo *ifenprodil sem distrator* demonstrou altos níveis de *freezing*, sendo igual ao grupo *veículo sem distrator*. Esse experimento será refeito devido ao baixo *freezing* do grupo *ifenprodil sem distrator* durante a reexposição.

A d-cicloserina é um fármaco comumente utilizado para facilitar a desestabilização da memória; portanto, a exposição de um animal por um tempo insuficiente para causar desestabilização da memória pode ser facilitada pela administração prévia de d-cicloserina. Já sabíamos, por experimentos prévios, que uma reexposição de 3 minutos era suficiente para causar a desestabilização da memória. No entanto, a reexposição de 3 minutos com distração não foi suficiente para causar redução da aversividade da memória. Por isso, resolvemos associar a d-cicloserina a reativação de 3 minutos, para avaliar se assim o estímulo distrator seria efetivo. A ausência de efeito da d-cicloserina (Figura 7, página 48) em facilitar o efeito da distração poderia ser explicada pelo fato de que a d-cicloserina só facilita o efeito em memórias que ainda não foram desestabilizadas pelo protocolo experimental e, no nosso caso, esse tempo de reexposição já causa labilização da memória.

Sabendo-se que inibidores de síntese proteica, que atuam como uma interferência química, são capazes de afetar tanto a consolidação quanto a reconsolidação da memória, perguntamo-nos se uma interferência comportamental como a que temos (estímulo distrator) também seria capaz de prejudicar o processo de consolidação. Já foi demonstrado que duas tarefas aprendidas num período de tempo muito próximo causam interferência retroativa mútua (Gordon 1977; Gordon & Spear 1973a; Gordon & Spear 1973b). Esse fenômeno também já foi muito observado em

estudos com humanos, principalmente através da utilização de listas de palavras. Quando se aprende uma lista de palavras e, logo em seguida outra, a segunda interfere, prejudicando a retenção da primeira (interferência retroativa). Da mesma forma, a estimulação elétrica transcraniana pode agir diminuindo a retenção em humanos, bem como memórias procedurais podem interferir em memórias declarativas, e vice-versa (Robertson 2012). Nesse estudo, demonstramos (Figura 5, página 45) que o estímulo distrator, quando apresentado logo após o treino (12 minutos), prejudica a consolidação da memória (Figura 8, página 49), agindo possivelmente como uma interferência; mas, não interfere na consolidação da memória quando apresentado 120 minutos após o treino (Figura 9, página 49).

A vantagem de um procedimento não-invasivo como o estímulo distrator é que, ao contrário das interferências químicas, há menos risco de parafefeitos, menos toxicidade, menos indução de tolerância, entre outros, sugerindo que abordagens não baseadas no uso de fármacos possam também ter um importante papel no tratamento de memórias traumáticas.

Apesar de não sabermos exatamente como o estímulo distrator age durante a sessão de reexposição, podemos sugerir que diminui a ansiedade / medo associado a memória original, possivelmente por dividir a atenção, sendo observada uma redução na evocação do medo em um teste posterior. Um trabalho desenvolvido com humanos suporta essa hipótese; nesse estudo, quando a evocação de uma memória foi realizada com atenção dividida, em um teste posterior, foi observado déficit de memória (Dudukovic et al. 2009).

Uma característica observada com o estímulo distrator, diferente de outros tratamentos que normalmente fazemos como infusão de fármacos, é que essa *distração* efetivamente *altera* o tempo total de congelamento *durante* a sessão de *reexposição*, que é menor que o do controle; esse fenômeno também foi demonstrado quando a reativação da memória foi realizada na presença de um estímulo apetitivo (chocolate) (Haubrich et al., no prelo). A maioria dos outros tratamentos, quando são realizados depois da sessão de reexposição / reativação, ou ainda antes dela, não mudam a performance na sessão de reexposição.

Acreditamos que o uso de estímulos distratores durante a reexposição ao contexto, isto é, quando supomos que a memória se encontra instável e pode ser modificada de forma duradoura mediante o processo da reconsolidação, seja um bom modelo animal para se investigar o efeito de interferências comportamentais sobre

memórias patológicas. Em princípio cremos ter reproduzido, em nosso modelo experimental, as mesmas condições de contorno que se dão em uma sessão de EMDR com pacientes humanos realizada para fins terapêuticos, e nossos achados são consistentes com os relatos clínicos que mostram a eficácia desta técnica cognitivo-comportamental na reversão de memórias aversivas. Muito embora nosso modelo não reproduza uma verdadeira situação de *estresse pós-traumático* – que envolveria sintomas como evitação / aversão, hiperalerta e evocação intrusiva (este último muito difícil de reproduzir em modelos animais) (Ehlers & Clark 2000; Berger 2009) – esses achados sugerem que o mecanismo subjacente de terapias como o EMDR seja o da *reconsolidação da memória* mediante distração do paciente durante um período de memória labilizada, fazendo com que a ansiedade associada a essa memória seja diminuída e, conseqüentemente, a memória reconsolide com um caráter aversivo menor, e assim se manifeste nas evocações posteriores. Portanto, muito embora esses achados ainda sejam de caráter preliminar se o objetivo for esclarecer o mecanismo completo por trás do EMDR, a possibilidade de que a reconsolidação seja este mecanismo abre caminho sólido para estudos mais profundos que, esperamos, revertam também em benefício da clínica de patologias tão devastadoras como o TEPT.

Esse modelo animal é importante não apenas para se entender as bases neurobiológicas de um procedimento clínico relevante em um animal mais simples (podendo futuramente contribuir até mesmo para melhorar a funcionalidade clínica da terapia), mas também como ciência básica, permitindo-nos compreender as dinâmicas bases neurobiológicas da memória.

7. CONCLUSÕES

7.1. A apresentação de um estímulo distrator durante a sessão de reexposição de 5 minutos (mas, não de 3 ou 12 minutos) ao contexto do treino no Condicionamento Aversivo Contextual foi capaz de reduzir a expressão do medo em sessões de teste realizadas 2 e 15 dias mais tarde; uma vez que a interferência estava presente durante a reexposição, o tempo de congelamento nesta sessão também diferiu significativamente com relação ao grupo controle;

7.2. Quando os animais, durante a sessão de reexposição, são expostos a um contexto diferente do original (do treino), o estímulo distrator não parece afetar a performance dos animais no teste, ou seja, não é efetivo em reduzir o medo associado a memória aversiva, supostamente por que a memória previamente consolidada não desestabiliza em um novo contexto;

7.3. Quando os animais, antes da sessão de reexposição, recebem a infusão sistêmica (i.p.) de um antagonista de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L - a nimodipina – o efeito do estímulo distrator é bloqueado e isso possivelmente ocorre porque a memória não foi desestabilizada;

7.4. Da mesma forma, quando os animais, antes da sessão de reexposição, recebem a infusão intrahipocampal de um antagonista seletivo para a subunidade GluN2B do receptor NMDA - o ifenprodil – o efeito do estímulo distrator em reduzir as respostas de medo é bloqueado e isso possivelmente ocorre devido ao bloqueio da desestabilização da memória.

7.5. O agonista parcial dos receptores NMDA, D-cicloserina, não foi capaz de tornar o estímulo distrator eficaz durante uma reexposição de 3 minutos.

7.6. Logo após o treino (no qual iniciou-se a consolidação da memória aversiva) o estímulo distrator foi efetivo em reduzir o medo associado a memória se essa reexposição se deu aos 12 minutos, mas não aos 120 minutos.

Tabela 1 – Resumo dos resultados encontrados

OBJETIVO	FIGURA	RESULTADO
3.1.1. Padronizar, na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto (CAC), o tempo de reexposição necessário (3, 5 ou 12 minutos) para que o estímulo distrator seja efetivo em reduzir o medo associado ao contexto em um teste sem a presença desse estímulo; após encontrar o(s) tempo(s) necessários para que o estímulo distrator seja efetivo, verificar se essa diminuição do medo se mantém em um reteste (15 dias após o teste 1).	Figura 1 Figura 2 Figura 3	7.1. A apresentação de um estímulo distrator durante a sessão de reexposição de 5 minutos (mas, não de 3 ou 12 minutos) ao contexto do treino no Condicionamento Aversivo Contextual foi capaz de reduzir a expressão do medo em sessões de teste realizadas 2 e 15 dias mais tarde; uma vez que a interferência estava presente durante a reexposição, o tempo de congelamento nesta sessão também diferiu significativamente com relação ao grupo controle;
3.1.2. Avaliar se a desestabilização da memória é dependente do contexto, expondo os animais a um contexto diferente do original.	Figura 4	7.2. Quando os animais, durante a sessão de reexposição, são expostos a um contexto diferente do original (do treino), o estímulo distrator não parece afetar a performance dos animais no teste, ou seja, não é efetivo em reduzir o medo associado a memória aversiva, supostamente por que a memória previamente consolidada não desestabiliza em um novo contexto;
3.1.3. Verificar se a modificação na memória original é dependente da desestabilização utilizando o bloqueador de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, nimodipina, injetada intraperitonealmente 30 minutos antes da reativação.	Figura 5	7.3. Quando os animais, antes da sessão de reexposição, recebem a infusão sistêmica (i.p.) de um antagonista de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L - a nimodipina – o efeito do estímulo distrator é bloqueado e isso possivelmente ocorre porque a memória não foi desestabilizada;
3.1.4. Avaliar se o hipocampo é necessário para que ocorra o processo de desestabilização / reconsolidação, infundindo localmente o bloqueador seletivo da subunidade GluN2B do receptor NMDA, ifenprodil, 15 minutos antes da reativação da memória;	Figura 6	7.4. Quando os animais, antes da sessão de reexposição, recebem a infusão intrahipocampal de um antagonista seletivo para a subunidade GluN2B do receptor NMDA - o ifenprodil – o efeito do estímulo distrator em reduzir as respostas de medo é bloqueado e isso possivelmente ocorre devido ao bloqueio da desestabilização da memória.
3.1.5. Avaliar se um agonista	Figura 7	7.5. O agonista parcial dos receptores

parcial dos receptores NMDA, D-cicloserina, poderia facilitar o efeito do estímulo distrator em uma sessão de reexposição mais curta (3 minutos).		NMDA, D-cicloserina, não foi capaz de tornar o estímulo distrator eficaz durante uma reexposição de 3 minutos.
3.1.6. Avaliar se o estímulo distrator é capaz de prejudicar a consolidação de uma memória quando apresentado durante uma sessão de reexposição 12 ou 120 minutos após a sessão de treino.	Figura 8 Figura 9	7.6. Quando os animais foram expostos a uma sessão de reexposição no período de consolidação da memória (12 minutos após o treino) o estímulo distrator foi efetivo em reduzir o medo associado a memória, mas não foi efetivo quando essa sessão de reexposição foi realizada 120 minutos após o treino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, J., Kavanagh, D., & Baddeley, A. (1997). Eyemovement and visual imagery: A working memory approach to the treatment of post-traumatic stress disorder. *British Journal of Clinical Psychology*, 36, 209–223.
- Agren, T., 2014. Human reconsolidation: A reactivation and update. *Brain research bulletin*.
- Alberini, C.M., 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in neurosciences*, 28(1), pp.51–6.
- Alberini, C.M. & Ledoux, J.E., 2013. Memory reconsolidation. *Current biology : CB*, 23(17), pp.R746–50.
- Alvares, L.D.E.O. et al., 2008. Opposite Action Of Hippocampal Cb1 Receptors In Memory Reconsolidation And Extinction. , 154, pp.1648–1655.
- Armstrong, M.S. & Vaughan, K., 1996. An Orienting Response Model Of Eye Movement. , 27(1), pp.21–32.
- Auber, A. et al., 2013. Post-retrieval extinction as reconsolidation interference: methodological issues or boundary conditions? *Psychopharmacology*, 226(4), pp.631–47.
- Baddeley, A., 2003. Working memory: looking back and looking forward. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(10), pp.829–39.
- Berger, 2009. Pharmacologic Alternatives to Antidepressants in Posttraumatic.
- Bergmann, U., 2010. EMDR's Neurobiological Mechanisms of Action: A Survey of 20 Years of Searching. *Journal of EMDR Practice and Research*, 4(1), pp.22–42.
- Bergmann, U., 2000. Further Thoughts on the Neurobiology of EMDR: The Role of the Cerebellum in Accelerated Information Processing. *Traumatology*, 6(3), pp.175–200.
- Bergmann, U., 2008. The Neurobiology of EMDR: Exploring the Thalamus and Neural Integration. *Journal of EMDR Practice and Research*, 2(4), pp.300–314.
- Besnard, A., 2012. A model of hippocampal competition between new learning and memory updating. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(10), pp.3281–3.
- Besnard, A., Caboche, J. & Laroche, S., 2012. Reconsolidation of memory: a decade of debate. *Progress in neurobiology*, 99(1), pp.61–80.
- Bingol, B. et al., 2010. Autophosphorylated CaMKII acts as a Scaffold to Recruit Proteasomes to Dendritic Spines. *Cell*, 140(4), pp.567–578.
- Bisson, J.I. et al., 2007. Psychological treatments for chronic post-traumatic stress disorder. Systematic review and meta-analysis. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, 190, pp.97–104.
- Boccia, M.M. et al., 2005. Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice: effects of a new different learning task. *Neuroscience*, 135(1), pp.19–29.

- Bouton, M.E. et al., 2005. Contextual and Temporal Modulation of Extinction : Behavioral and Biological Mechanisms Contextual Modulation of Extinction Performance :
- Bradley, R. et al., 2005. Reviews and Overviews A Multidimensional Meta-Analysis of Psychotherapy for PTSD. , (February), pp.214–227.
- Brunet, A. et al., 2008. Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder. *Journal of psychiatric research*, 42(6), pp.503–6.
- Bustos, S.G., 2009. Disruptive Effect of Midazolam on Fear Memory Reconsolidation : Decisive Influence of Reactivation Time Span and Memory Age. , pp.446–457.
- Cocoz, V., Maldonado, H. & Delorenzi, A., 2011. The Enhancement Of Reconsolidation With A Naturalistic Mild Stressor Improves The Expression Of A Declarative Memory In Humans. *NSC*, 185, pp.61–72.
- Costanzi, M. et al., 2011. Extinction after retrieval: effects on the associative and nonassociative components of remote contextual fear memory. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 18(8), pp.508–18.
- Delorenzi, A. & Frenkel, L., 2005. Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation : an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. , 22(August), pp.1757–1766.
- De Oliveira Alvares, L. et al., 2013. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*, 244, pp.42–8. A
- Devilley, 2001. the Behavior Therapist , 24, 18-21. *The Behavior Therapist*, pp.18–21.
- Devilley, G.J., Ono, M. & Lohr, J.M., 2014. The use of meta-analytic software to derive hypotheses for EMDR. *Journal of behavior therapy and experimental psychiatry*, 45(1), pp.223–5.
- Doyère, V. et al., 2007. Synapse-specific reconsolidation of distinct fear memories in the lateral amygdala. *Nature neuroscience*, 10(4), pp.414–6.
- Dudai, Y., 2004. The Neurobiology Of Connsolidations , or , How S Table Is The Engram ? , pp.51–86.
- Dudai, Y. & Eisenberg, M., 2004. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron*, 44(1), pp.93–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15450162>.
- Dudukovic, N.M., Dubrow, S. & Wagner, A.D., 2009. Attention during memory retrieval enhances future remembering. *Mem Cognit.*, 37(7), pp.953–961.
- Dyck, M.J., 1993. A proposal for a conditioning model of eye movement desensitization treatment for posttraumatic stress disorder. *Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry*, 24(3), pp.201–210.
- Ehlers, A. & Clark, D.M., 2000. A cognitive model of posttraumatic stress disorder. , 38.
- Eisenberg, M. et al., 2003. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5636), pp.1102–4.
- Engelhard, I.M., van den Hout, M. a. & Smeets, M. a. M., 2011. Taxing working memory reduces vividness and emotional intensity of images about the Queen's

- Day tragedy. *Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry*, 42(1), pp.32–37.
- Engelhard, I.M., van Uijen, S.L. & van den Hout, M. a., 2010. The impact of taxing working memory on negative and positive memories. *Journal of Aesthetics & culture*, 1, pp.1–8.
- Etten, M.L. Van & Taylor, S., 1998. Comparative Efficacy of Treatments for Post-traumatic Stress Disorder : A Meta-Analysis. , 144.
- Finnie, P.S.B. & Nader, K., 2012. The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 36(7), pp.1667–707.
- Fonseca, R., Nägerl, U.V. & Bonhoeffer, T., 2006. Neuronal activity determines the protein synthesis dependence of long-term potentiation. *Nature neuroscience*, 9(4), pp.478–80.
- Forcato, C. et al., 2007. Reconsolidation of declarative memory in humans. , pp.295–303.
- Fuente, D., Freudenthal, R. & Romano, A., 2011. Reconsolidation or Extinction : Transcription Factor Switch. , 31(15), pp.5562–5573.
- Gamache, K., Pitman, R.K. & Nader, K., 2012. Preclinical Evaluation of Reconsolidation Blockade by Clonidine as a Potential Novel Treatment for Posttraumatic Stress Disorder. , 37(13), pp.2789–2796.
- Gordon, W.C., 1977. Similarities of recently acquired and reactivated memories in interference. , 90(2), pp.231–242.
- Gordon, W.C. & Spear, N.E., 1973a. Effect of reactivation of a previously acquired memory on the interaction between memories in the rat. *Journal of experimental psychology*, 99(3), pp.349–55.
- Gordon, W.C. & Spear, N.E., 1973b. The effects of strychnine on recently acquired and reactivated passive avoidance memories. *Physiology & behavior*, 10(6), pp.1071–5.
- Gunter, R.W. & Bodner, G.E., 2008. How eye movements affect unpleasant memories: support for a working-memory account. *Behaviour research and therapy*, 46(8), pp.913–31.
- Hardt, O., Einarsson, E.O. & Nader, K., 2010. A bridge over troubled water: reconsolidation as a link between cognitive and neuroscientific memory research traditions. *Annual review of psychology*, 61, pp.141–67.
- Haubrich, J., Crestani, AP., Cassini, L., Sierra, RO, Santana, F., de Oliveira Alvares, Quillfeldt, JA. 2014. Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive. *Neurophysiopharmacology*, no prelo.
- Ho, M.S.K. & Lee, C.W., 2012. Cognitive behaviour therapy versus eye movement desensitization and reprocessing for post-traumatic disorder – is it all in the homework then ? Thérapie cognitivo-comportementale et eye movement desensitization and reprocessing (EMDR) dans la prise en c. , 62, pp.253–260.
- Izquierdo, I., 2009. Izquierdo, I. (2009) Questões sobre memória.1ª edição.Porto Alegre. Editora Unisinos. 128p. *Editora Unisinos*, p.128.
- Izquierdo, I., 2011. *Memória*, 2ª edição. Porto Alegre. Artmed. p.136. *Editora Artmed*.

- Izquierdo, I., 1989. Memórias. *Estudos Avançados*, 3(6), pp.89–112.
- Izquierdo, L.A. et al., 2002. Molecular Pharmacological Dissection of Short- and Long-Term Memory. , 22(3), pp.269–287.
- Kaang, B.-K., Lee, S.-H. & Kim, H., 2009. Synaptic protein degradation as a mechanism in memory reorganization. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 15(5), pp.430–5.
- Kandel, E.R., 2002. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Bioscience reports*, 24(4-5), pp.475–522.
- Kaye, B. & Ph, D., Reversing Reciprocal Suppression in the Anterior Cingulate Cortex : A Hypothetical Model to Explain EMDR Effectiveness 875 Walnut St ., Suite 220 Reversing Reciprocal Suppression in the Anterior Cingulate Cortex : A Hypothetical Model to Explain EMDR Effe.
- Kindt, M., Soeter, M. & Vervliet, B., 2009. Beyond extinction: erasing human fear responses and preventing the return of fear. *Nature neuroscience*, 12(3), pp.256–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19219038> [Accessed February 19, 2014].
- Lechner, H.A. et al., 1999. 100 Years of Consolidation — Remembering Müller and Pilzecker. , pp.77–87.
- Lee, C.W. & Cuijpers, P., 2013. A meta-analysis of the contribution of eye movements in processing emotional memories. *Journal of behavior therapy and experimental psychiatry*, 44(2), pp.231–9.
- Lee, J.L.C., 2010. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 4(November), p.168.
- Lee, J.L.C., Everitt, B.J. & Thomas, K.L., 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5672), pp.839–43.
- Lee, J.L.C., Milton, A.L. & Everitt, B.J., 2006. Reconsolidation and Extinction of Conditioned Fear : Inhibition and Potentiation. , 26(39), pp.10051–10056.
- Lee, S.-H. et al., 2012. A cellular model of memory reconsolidation involves reactivation-induced destabilization and restabilization at the sensorimotor synapse in Aplysia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(35), pp.14200–5.
- Lee, S.-H. et al., 2008. Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), pp.1253–6.
- Ben Mamou, C., Gamache, K. & Nader, K., 2006. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nature neuroscience*, 9(10), pp.1237–9.
- Maxfield, L. & Hyer, L., 2002. The Relationship between Efficacy and Methodology in Studies Investigating EMDR Treatment of PTSD. , 58(November 1999), pp.23–41.
- McGaugh, J.L., 2000. Memory--a Century of Consolidation. *Science*, 287(5451), pp.248–251.
- Mcgaugh, J.L., Time-Dependent Processes in Memory Storage. , pp.1351–1358.
- Milad, M.R. & Quirk, G.J., 2002. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. , 420(September), pp.713–717.

- Misanin, J.R., Miller, R.R. & Lewis, D.J., 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science (New York, N.Y.)*, 160(3827), pp.554–5.
- Nader, K. & Hardt, O., 2009. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(3), pp.224–34.
- Nader, K., Schafe, G.E. & Le Doux, J.E., 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), pp.722–6.
- Orsini & Maren, A., 2012. NIH Public Access. *Neurosci Biobehav Rev*, 36(7), pp.1773–1802.
- Osan, R., Tort, A.B.L. & Amaral, O.B., 2011. A mismatch-based model for memory reconsolidation and extinction in attractor networks. *PloS one*, 6(8), p.e23113.
- Pearson, H.J., 2009. Present and Accounted For: Sensory Stimulation and Parietal Neuroplasticity. *Journal of EMDR Practice and Research*, 3(1), pp.39–49.
- Pedreira, M.E., Pérez-cuesta, L.M. & Maldonado, H., 2004. Mismatch Between What Is Expected and What Actually Occurs Triggers Memory Reconsolidation or Extinction Mismatch Between What Is Expected and What Actually Occurs Triggers Memory Reconsolidation or Extinction. , pp.579–585.
- Pérez-Cuesta, L.M. & Maldonado, H., 2009. Memory reconsolidation and extinction in the crab: mutual exclusion or coexistence? *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(11), pp.714–21.
- Pitman, R.K., 2011. Will reconsolidation blockade offer a novel treatment for posttraumatic stress disorder? *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5(March), p.11.
- Poundja, J. et al., 2012. Trauma reactivation under the influence of propranolol: an examination of clinical predictors. *European journal of psychotraumatology*, 3(2), pp.1–9.
- Quillfeldt, J.A., 2010. Quillfeldt, J.A., 2010. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. In: *Animlas Models as Tools in Ethics Biomedical Research. 2010.*
- Rasolkhani-Kalhorn, T. & Harper, M.L., 2006. EMDR and Low Frequency Stimulation of the Brain. *Traumatology*, 12(1), pp.9–24.
- Robertson, E.M., 2012. NIH Public Access. *Current Biology : CB*, 22(2).
- Rodenburg, R. et al., 2009. Efficacy of EMDR in children: a meta-analysis. *Clinical psychology review*, 29(7), pp.599–606.
- Rodrı, L.C. & Forcato, C., 2011. Repeated Labilization-Reconsolidation Processes Strengthen Declarative Memory in Humans. , 6(8).
- Russell, M.C., 2008. Scientific resistance to research, training and utilization of eye movement desensitization and reprocessing (EMDR) therapy in treating post-war disorders. *Social science & medicine (1982)*, 67(11), pp.1737–46.
- Schiller, D. et al., 2010. Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature*, 463(7277), pp.49–53.
- Schubert, S.J., Lee, C.W. & Drummond, P.D., 2011. The efficacy and psychophysiological correlates of dual-attention tasks in eye movement

- desensitization and reprocessing (EMDR). *Journal of anxiety disorders*, 25(1), pp.1–11.
- Shapiro, F., 2007. EMDR Princípios Básicos, Protocolos e Procedimentos - Dessensibilização e Reprocessamento Através de Movimentos Oculares - 2ª edição - Livro - Editora Nova Temática - FRANCINE SHAPIRO - ISBN 8560741011. , p.457.
- Shapiro, F., 1989. Eye movement desensitization: a new treatment for post-traumatic stress disorder. *Journal of behavior therapy and experimental psychiatry*, 20(3), pp.211–7.
- Shaw, J.A. et al., 2012. Role Of Calcineurin In Inhibiting Disadvantageous Associations. *NSC*, 203, pp.144–152.
- Sierra, R.O. et al., 2013. consolidated memories Reconsolidation may incorporate state-dependency into previously consolidated memories. , pp.379–387.
- Solomon, R.M. & Shapiro, F., 2008. EMDR and the Adaptive Information Processing Model
Potential Mechanisms of Change. *Journal of EMDR Practice and Research*, 2(4), pp.315–325.
- Stickgold, R., 2002. EMDR : A Putative Neurobiological Mechanism of Action. , 58(1), pp.61–75.
- Suárez, L.D., Smal, L. & Delorenzi, A., 2010. Updating contextual information during consolidation as result of a new memory trace. *Neurobiology of learning and memory*, 93(4), pp.561–71.
- Suzuki, A. et al., 2008. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. , pp.426–433.
- Suzuki, A. et al., 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(20), pp.4787–95.
- Van den Hout, M. a et al., 2011. EMDR: eye movements superior to beeps in taxing working memory and reducing vividness of recollections. *Behaviour research and therapy*, 49(2), pp.92–8.
- Von Herten, L.S.J. & Giese, K.P., 2005. Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(8), pp.1935–42.
- Walker, M.P., Brakefield, T. & Hobson, J.A., 2003. Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation. , 425(October), pp.8–12.
- Wang, S.-H., de Oliveira Alvares, L. & Nader, K., 2009. Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nature neuroscience*, 12(7), pp.905–12.