

Características espectrais da atividade elétrica hipocampal durante o medo condicionado ao contexto

Spectral characteristics of the hippocampal LFP during contextual fear conditioning

Birajara Soares Machado¹, Ana Carolina Bione Kunicki², Edgard Morya³, Koichi Sameshima²

RESUMO

Objetivo: O hipocampo tem um importante papel na aquisição e evocação das memórias aversivas. Pretendeu-se, neste trabalho, investigar a dinâmica entre os ritmos hipocâmpais durante a evocação das memórias aversivas recente e remota. **Métodos:** Foram implantadas matrizes de microeletrodos em ratos Wistar. Os animais foram treinados e testados numa tarefa de condicionamento contextual de medo. O treino consistiu em aplicações de choques nas patas. O teste de memória foi realizado 1 dia (memória recente) ou 18 dias (memória remota) após o treino. Nesse trabalho, foi proposta uma medida baseada no espectro de potências, denominada “razão delta-theta”, para caracterização dos diferentes comportamentos observados (vigília exploratória e congelamento) e tipos de memórias. **Resultados:** A razão delta-theta mostrou-se capaz de distinguir os grupos testados para as memórias recente e remota. Neste caso, observou-se, para o grupo testado 18 dias após, um valor menor do que para o grupo testado 1 dia após. Além disso, essa medida mostrou-se útil para distinguir os diferentes estados comportamentais. **Conclusões:** Os resultados sugerem que a dinâmica entre os ritmos delta e theta pode refletir o processamento da informação durante a evocação das memórias recente e remota.

Descritores: Hipocampo; Memória; Medo/fisiologia; Amnésia retrógrada

ABSTRACT

Objective: The hippocampus has an important role in the acquisition and recall of aversive memories. The objective of this study was to investigate the relationship among hippocampal rhythms. **Methods:** Microelectrode arrays were implanted in the hippocampus of Wistar rats. The animals were trained and tested in a contextual fear conditioning task. The training consisted in applying shocks in the legs. The memory test was performed 1 day (recent memory) or 18

days (remote memory) after training. We proposed a measure based on the FFT power spectrum, denominated “delta-theta ratio”, to characterize the different behaviors (active exploration and freezing) and the memories types. **Results:** The delta-theta ratio was able to distinguish recent and remote memories. In this study, the ratio for the 18-day group was smaller than for the 1-day group. Moreover, this measure was useful to distinguish the different behavior states – active exploration and freezing. **Conclusions:** The results suggest delta-theta oscillations could reflect the demands on information processing during recent and remote memory recalls.

Keywords: Hippocampus; Memory; Fear/physiology; Amnesia retrograde

INTRODUÇÃO

O hipocampo tem um importante papel na aquisição das memórias aversivas. Entretanto, essas memórias não ficam armazenadas permanentemente nessa estrutura. Lesões do hipocampo, em humanos e animais, produzem um grave déficit na memória recente, mas não na remota⁽¹⁻³⁾. A hipótese atual sugere que o hipocampo está dinamicamente envolvido num processo gradual de reorganização e estabilização das memórias no neocórtex⁽⁴⁻⁶⁾.

Evidências a partir de experimentos realizados por Bontempi et al.⁽⁷⁾ e Frakland et al.⁽⁸⁾ mostram que várias regiões corticais, como o cíngulo anterior e os córtices pré e infralímbico, estão envolvidas no processamento das memórias aversivas, coerentes com a proposta de que as memórias remotas são armazenadas em redes corticais distribuídas. Inúmeros estudos têm in-

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo (SP), Brasil.

¹ Instituto do Cérebro – Ince, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

² Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo (SP), Brasil.

³ Associação Alberto Santos Dumont para Apoio à Pesquisa – São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Birajara Soares Machado – Avenida Albert Einstein, 627/701 – Morumbi – CEP: 05652-000 – São Paulo (SP), Brasil – Tel.: (11) 2151-7354 – E-mail: birasm@gmail.com

Data de submissão: 1/9/2011 – Data de aceite: 24/4/2012

Conflitos de interesse: não há.

vestigado as bases celulares e moleculares envolvidas na evocação e no armazenamento de memórias recentes e remotas⁽⁹⁻¹²⁾. No entanto, os mecanismos eletrofisiológicos envolvidos no circuito córtico-hipocampal ao longo do tempo ainda não são bem conhecidos.

Em ratos, um excelente paradigma para o estudo comportamental das memórias recentes e remotas é o condicionamento contextual ao medo^(1,2). Tal paradigma consiste em colocar o animal em um determinado contexto (pré-exposição) e aplicar choques elétricos nas patas (treino). O teste de memória é realizado com dois grupos separados de ratos treinados com 5 choques nas patas e testados 1 dia (memória recente) ou 18 dias (memória remota) após o treino. Usando esse paradigma, selecionaram-se dois estados comportamentais: a vigília exploratória, na pré-exposição, e o congelamento, comportamento característico observado nos testes de memória aversiva. Adicionalmente, dois grupos controles foram estabelecidos por animais que foram submetidos ao treinamento sem choques, mas realizaram os testes de memória. O comportamento selecionado neste caso foi o de vigília quieta, o estado mais parecido com o congelamento.

MÉTODOS

Foram utilizados 12 ratos Wistar machos provenientes da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) pesando aproximadamente 300g no início do experimento. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro a cada 12/12h, no qual as luzes foram acesas às 7h. Água e comida foram oferecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos adotados estão de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FMUSP (CAPPesq 0948/09).

Os animais foram pesados e anestesiados com cloridrato de cetamina (100mg/kg) e cloridrato de xilazina (4mg/kg), após prévia indução anestésica com halotano a 5%. O nível anestésico foi mantido com doses suplementares de 20% da dose inicial de cloridrato de cetamina a cada hora ou sempre que o animal apresentasse sensibilidade à dor. Após tricotomia e antisepsia do campo cirúrgico, os ratos foram posicionados em um aparelho estereotáxico (modelo 900, *David Kopf Instruments*, Tujunga, California) e realizou-se uma incisão longitudinal da pele na linha média do crânio. Uma broca dental de alta rotação foi utilizada para realizar a craniotomia e a abertura de três orifícios nos quais foram inseridos microparafusos de aço inoxidável. Os microparafusos servem para fixar o implante no crânio com cola de cianoacrilato e também como pontos

de contato para a referência do fio terra. As matrizes de microeletrodos foram implantadas por técnica estereotáxica na região CA1 do hipocampo, com o centro nas seguintes coordenadas anteroposterior (AP), mediolateral (ML) e dorsoventral (DV), relativas ao bregma: AP -3,60; ML 2,60 e DV 2,10mm.

Uma semana após a cirurgia de implante, foi realizado o registro do potencial de campo local usando um equipamento de aquisição (*Multichannel Acquisition Processor*, Plexon Inc., Dallas). Os sinais foram pré-amplificados (1000x), filtrados por um passa-alto de 0,3Hz e um passa-baixo de 400Hz e digitalizados por meio de uma placa (*National Instruments, Austin*) de 64 canais com uma frequência de aquisição de 2kHz.

Os ratos treinados foram divididos em dois grupos (G1 e G18, seis animais por grupo). Todos os animais receberam implante de microeletrodos para registro da atividade elétrica hipocampal e sofreram eutanásia após o teste, sendo o grupo G1 1 dia após o treino e o grupo G18 18 dias após o treino. Todos os animais foram treinados e testados numa tarefa de condicionamento contextual ao medo. Para tanto, foi utilizada uma caixa de condicionamento com dimensões $26 \times 21 \times 27,5 \text{cm}^3$, que possui paredes pretas e tampa de acrílico transparente. A base é formada por uma grade metálica (com arestas de 16,4mm de diâmetro e equidistantes em 1,2cm) conectadas a uma fonte geradora de choques elétricos em corrente descontínua. A caixa de condicionamento foi alocada dentro de uma gaiola de Faraday com dimensões $89,5 \times 79 \times 54 \text{cm}^3$. No teto superior dessa gaiola colocou-se uma câmera de vídeo CCD com infravermelho para registrar o comportamento do animal durante a realização da tarefa.

Os animais foram submetidos a sessões de habituação ao experimentador e ao ambiente, sendo este distinto do local de condicionamento, durante 5 minutos por dia, ao longo de 7 dias consecutivos. As sessões de treino e teste foram realizadas na fase clara do ciclo circadiano do rato. No primeiro dia (pré-exposição ao contexto), o animal foi colocado na caixa de condicionamento por 5 minutos. No segundo dia (treino), o animal foi colocado na caixa de condicionamento e, após 2 minutos, recebeu choques elétricos aplicados nas patas. Cada choque com intensidade de 0,7mA e duração de 2 segundos. Foram aplicados 5 choques intercalados por 1 minuto. Os animais foram reintroduzidos na caixa de condicionamento para os testes de evocação das memórias recente (grupo G1) ou remota (grupo G18). O tempo de congelamento foi cronometrado pelo experimentador observando o comportamento do animal por meio da câmera de vídeo CCD.

A análise do comportamento foi realizada a partir da inspeção visual, quadro a quadro, do vídeo dos animais. Este foi classificado em vigília quieta, vigília exploratória e congelamento. O animal foi considerado em vigília exploratória quando apresentava intensa atividade locomotora e em congelamento quando apresentava ausência total de movimentos, exceto aqueles associados aos movimentos respiratórios. A vigília quieta neste contexto é comportamentalmente equivalente ao congelamento. A figura 1 mostra a taxa de congelamento para os grupos treinados e controle (animais que não levaram choques nas patas).

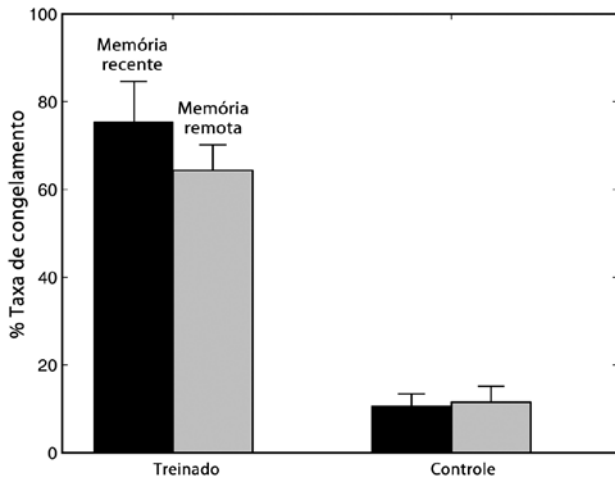


Figura 1. Comparação da taxa de congelamento dos animais treinados e controles. Subdividem-se os treinados naqueles que fizeram o teste 1 dia pós treino (memória recente) e 18 dias pós-treino (memória remota)

A perfusão foi realizada através do ventrículo esquerdo com paraformaldeído tamponado 0,1M. Antes da abertura da cavidade torácica, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (350mg/kg) e cloridrato de xilazina (4mg/kg). Após a perfusão, o cérebro foi removido e congelado a -80°C até posterior corte e coloração do tecido. Foi realizada a coloração de Nissl usando o corante cresil violeta para identificar a posição dos eletrodos.

Foram selecionados segmentos (com duração de 2 segundos) dos registros eletrofisiológicos nos dois comportamentos de interesses: vigília exploratória e congelamento. O primeiro está relacionado com sinais registrados antes de o animal ser submetido às aplicações dos choques nas patas. O comportamento de congelamento foi registrado com o intuito de comparar os ritmos cerebrais nos processos de evocação das memórias recente e remota. A figura 2 ilustra exemplos dos três estágios de interesse. Os registros relacionados com a vigília quieta foram obtidos dos grupos controle.

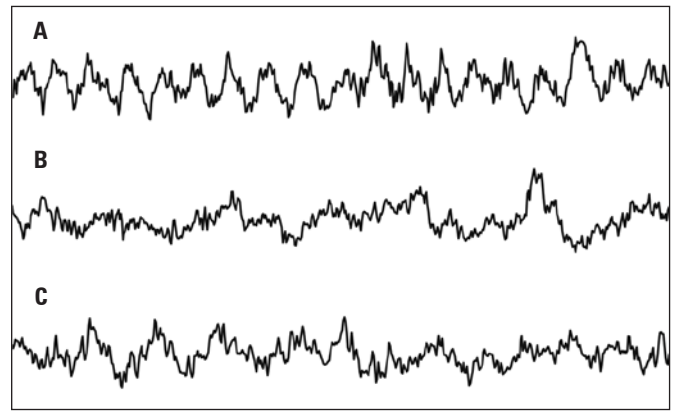


Figura 2. Segmentos de 2 segundos da atividade elétrica hipocampal nos estados comportamentais: (A) vigília exploratória; (B) congelamento 1 dia pós-treino; e (C) congelamento 18 dias pós-treino. Os sinais estão na escala de ±0,5mV

Para estudar os mecanismos eletrofisiológicos envolvidos no condicionamento do medo propôs-se uma medida baseada na razão dos espectros de potências, considerando as contribuições referentes às oscilações lentas, ou seja,

$$\rho_{\delta\theta} = \bar{E}_{\delta} / \bar{E}_{\theta}$$

onde

$$\bar{E}_{\omega} = \frac{\int_{\nu_s}^{\nu_e} |\tilde{f}(\nu)|^2 d\nu}{\int_{\nu_s}^{\nu_e} d\nu}$$

e $f(\nu)$ é a transformada de Fourier do sinal $f(t)$. Desta forma, \bar{E}_{ω} é interpretado como o espectro de potências normalizado de um específico sinal eletrofisiológico $f(t)$ em uma determinada escala de frequências $\omega = [\nu_s, \nu_e]$. A medida $\rho_{\delta\theta}$ é definida como a razão entre as energias médias dos ritmos delta (0,5 a 4Hz) e theta (4 a 10Hz), ver exemplos na figura 3. O estimador do espectro de potências utilizado neste trabalho foi proposto por Welch⁽¹³⁾. Este procedimento consiste em dividir a série temporal em segmentos sobrepostos. Para cada segmento obtém-se o respectivo espectro de potências e calcula-se a média sobre as estimativas.

Os testes estatísticos para comparação da razão delta-theta foram o testes não paramétricos de Wilcoxon (teste W), para comparações pareadas, e o de Mann-Whitney (teste U) para comparação de amostras independentes. Devido ao tamanho da amostra (6 animais por grupo) optou-se em não realizar um teste de normalidade. A comparação dos valores de $\rho_{\delta\theta}$ nos estados de vigília, exploratória G1 e G18 e os dois grupos controles, foi realizada com um teste ANOVA de 1 via (teste F). O nível de significância adotado para todos os testes estatísticos foi de 0,05.

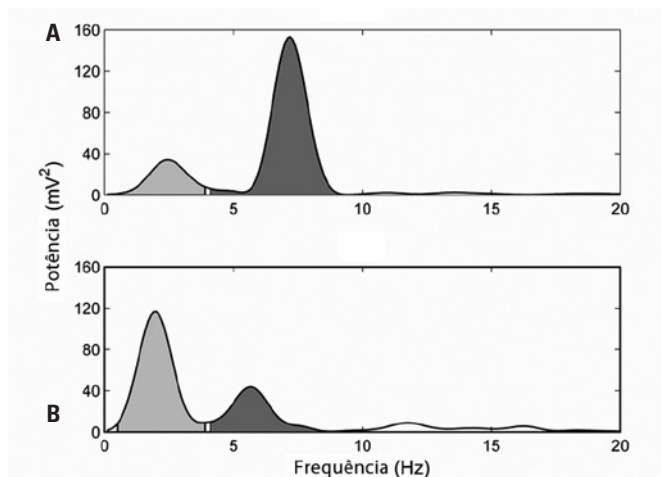


Figura 3. Espectros de potências característicos dos estados de (A) vigília exploratória e (B) congelamento; as respectivas razões delta-theta são 0,415 e 3,748

RESULTADOS

A razão delta-theta mostrou-se capaz de caracterizar as memórias recente e remota ($p < 0,005$; teste U). Neste caso, a razão para os animais testados 18 dias após ($3,231 \pm 0,970$) é menor que o grupo testado 1 dia após ($6,778 \pm 1,316$). Caracterizando uma atividade mais lenta durante evocação da memória recente. Além disso, esta medida mostrou-se útil para distinguir os diferentes estados comportamentais, vigília exploratória ($0,314 \pm 0,099$, grupo G1; $0,370 \pm 0,208$, grupo G18) e congelamento ($p < 0,05$; para os dois grupos; teste W). Mais especificamente, a medida $\rho_{\delta\theta}$ referente aos animais em vigília exploratória é menor quando comparada aos animais em congelamento. Verificou-se uma diferença significativa ($p < 0,005$; teste U) na comparação dos valores de $\rho_{\delta\theta}$ obtidos no teste com os respectivos grupos controle ($0,309 \pm 0,033$, 1 dia após; $0,341 \pm 0,050$,

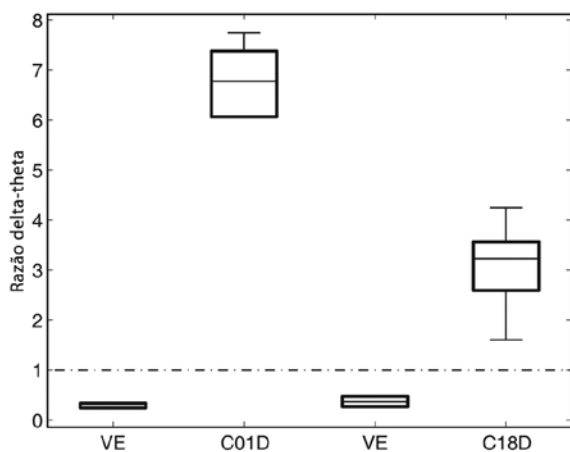


Figura 4. Diagrama de caixas da razão delta-theta durante a vigília exploratória (VE) e congelamento 1 (C01D) e 18 dias (C18D) após o treino

18 dias após) obtidos durante vigília quieta. Por fim, um teste ANOVA foi aplicado nos valores de $\rho_{\delta\theta}$ referentes aos estados comportamentais de vigília, exploratória e quieta, onde não se constatou nenhuma diferença significativa ($p = 0,241$; teste F). A figura 4 resume os principais resultados.

DISCUSSÃO

No paradigma comportamental estudado, o nível de congelamento foi utilizado como um indicativo da taxa de retenção de memória. Observou-se uma diminuição na taxa de congelamento ao longo do tempo em função do tipo de memória evocada. Resultados similares foram descritos por Rudy e Wright-Hardesty⁽¹⁴⁾. Esses autores mostraram que existe uma relação direta entre o nível de congelamento e o intervalo entre o treino e o teste de retenção de memória. Adicionalmente, constatou-se, pela razão delta-theta, que o padrão eletrofisiológico característico do hipocampo durante o congelamento também diminuiu. Está bem estabelecido na literatura que, durante a vigília exploratória, a atividade elétrica cerebral predominante no hipocampo é o ritmo theta⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Nossos resultados corroboram esses achados e acrescentam que, durante a reação de congelamento, houve um significativo aumento de atividade cerebral característica no ritmo delta em relação ao theta hipocampal.

Um modelo para explicar a dinâmica cerebral oscilatória foi proposto por Lakatos et al.⁽¹⁸⁾. Esses pesquisadores sugerem que existe uma organização hierárquica na atividade elétrica cerebral, no qual a amplitude de cada frequência oscilatória é modulada pela fase de uma oscilação de baixa frequência. Lakatos et al.⁽¹⁹⁾ mostraram antes que a fase dessas atividades oscilatórias controlam a excitabilidade de populações neuronais corticais e, dessa forma, podem influenciar o processamento de estímulos sensoriais. Ainda são necessários mais estudos a cerca da dinâmica de interação entre os ritmos cerebrais, visto que esta pode ser um importante mecanismo capaz de favorecer os processos de consolidação da memória. Nesse trabalho, verificou-se que a dinâmica entre as ondas delta e theta se altera em função do tipo de memória evocada.

Frankland et al.⁽⁸⁾ relataram que os genes imediatos *Zif-268* e *Fos* são intensamente ativados no hipocampo após a evocação da memória recente, mas não da memória remota. O contrário foi observado no córtex pré-frontal medial, no qual se verificou um aumento significativo na expressão desses genes após a evocação da memória remota, mas não da memória recente. Esses

resultados indicam que a evocação de diferentes tipos de memória é mediada por mecanismos distintos em diferentes regiões do cérebro.

A razão delta-theta mostrou-se uma medida útil na caracterização dos estados comportamentais. Adicionalmente, diferenciou os grupos de animais em congelamento durante a evocação das memórias recente e remota. Dessa forma, a relação entre os ritmos delta e theta pode ser um importante parâmetro a ser considerado no estudo dos processos relacionados ao aprendizado e à memória.

Outra questão relevante é o aumento expressivo da contribuição do ritmo delta acompanhado da diminuição do ritmo theta durante a evocação da memória recente. O que pode indicar uma lentificação da atividade hipocampal. Sabendo-se que o hipocampo tem um importante papel na aquisição da memória recente, mas não da memória remota, sugere-se que o mesmo esteja coordenando a distribuição da informação para o neocórtex ao longo do tempo. É possível que a lentificação do hipocampo favoreça a comunicação da circuitaria córtico-hipocampal, visto que o neocórtex apresenta uma atividade mais lenta^(20,21). Propõe-se que a comunicação entre as áreas cerebrais ocorre por meio de eventos de sincronização e que estes seriam facilitados por áreas com atividades ressonantes. Por fim, o posterior restabelecimento da atividade theta hipocampal pode ser interpretado como uma diminuição da participação hipocampo nos processos de memória.

CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a dinâmica entre os ritmos delta e theta podem refletir o processamento da informação durante a evocação das memórias recente e remota.

AGRADECIMENTOS

Ao Fórum Permanente das Relações Universidade-Empresa (UNIEMP) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERÊNCIAS

1. Kim JJ, Fanselow MS. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*. 1992;256(5057):675-7.
2. Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J Neurosci*. 1999;19(3):1106-14.
3. Manns JR, Hopkins RO, Squire LR. Semantic memory and the human hippocampus. *Neuron*. 2003;38(1):127-33.
4. Zola-Morgan SM, Squire LR. The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. *Science*. 1990;250(4978):288-90.
5. Squire LR, Alvarez P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol*. 1995;5(2):169-77.
6. Knowlton BJ, Fanselow MS. The hippocampus, consolidation and on-line memory. *Curr Opin Neurobiol*. 1998;8(2):293-6.
7. Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature*. 1999;400(6745):671-5.
8. Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*. 2004;304(5672):881-3.
9. Routtenberg A, Cantalalops I, Zaffuto S, Serrano P, Namgung U. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(13):7657-62.
10. Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science*. 2004;305(5680):96-9.
11. Frankland PW, Bontempi B. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(2):119-30.
12. Takehara-Nishiuchi K, Nakao K, Kawahara S, Matsuki N, Kirino Y. Systems consolidation requires postlearning activation of NMDA receptors in the medial prefrontal cortex in trace eyeblink conditioning. *J Neurosci*. 2006;26(19):5049-58.
13. Welch PD. The use of fast fourier transform for the estimation of power spectra: a method based on time averaging over short, modified periodograms. *IEEE Trans Audio Electroacoust*. 1967;15(2):70-3.
14. Rudy JW, Wright-Hardesty K. The temporal dynamics of retention of a context memory: something is missing. *Learn Mem*. 2005;12(2):172-7.
15. Vanderwolf CH. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1969;26(4):407-18.
16. Gavrilov VV, Wiener SI, Berthoz A. Enhanced hippocampal theta EEG during whole body rotations in awake restrained rats. *Neurosci Lett*. 1995;197(3):239-41.
17. Slawinska U, Kasicki S. The frequency of rat's hippocampal theta rhythm is related to the speed of locomotion. *Brain Res*. 1998;796(1-2):327-31.
18. Lakatos P, Shah AS, Knuth KH, Ulbert I, Karmos G, Schroeder CE. An oscillatory hierarchy controlling neuronal excitability and stimulus processing in the auditory cortex. *J Neurophysiol*. 2005;94(3):1904-11.
19. Lakatos P, Szilágyi N, Pincze Z, Rajkai C, Ulbert I, Karmos G. Attention and arousal related modulation of spontaneous gamma-activity in the auditory cortex of the cat. *Brain Res Cogn Brain Res*. 2004;19(1):1-9.
20. Sirota A, Csicsvari J, Buhl D, Buzsáki G. Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(4):2065-9.
21. Mölle M, Yeshenko O, Marshall L, Sara SJ, Born J. Hippocampal sharp wave-ripples linked to slow oscillations in rat slow-wave sleep. *J Neurophysiol*. 2006;96(1):62-70.