

PUCRS

ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LAURA TARTARI NEVES

**ANÁLISE ESTRUTURAL E METABÓLICA DE NEURÔNIOS DA AMÍGDALA BASOLATERAL
DE RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO**

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LAURA TARTARI NEVES

**ANÁLISE ESTRUTURAL E METABÓLICA DE NEURÔNIOS DA AMÍGDALA
BASOLATERAL DE RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE
ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO**

Porto Alegre

2019

LAURA TARTARI NEVES

**ANÁLISE ESTRUTURAL E METABÓLICA DE NEURÔNIOS DA AMÍGDALA
BASOLATERAL DE RATOS *Wistar* SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE
ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO**

Orientador: Prof. Dr. Léder Leal Xavier

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção
do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em
Biologia e Celular e Molecular da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica

N518a Neves, Laura Tartari

Análise estrutural e metabólica de neurônios da amígdala basolateral de ratos Wistar submetidos ao protocolo de estresse pós-traumático / Laura Tartari Neves . – 2019.

66 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Leder Leal Xavier.

1. TEPT. 2. Amígdala. 3. Espinhos dendríticos. 4. 18F-FDG. 5. microPET. I. Xavier, Leder Leal. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

LAURA TARTARI NEVES

**ANÁLISE ESTRUTURAL E METABÓLICA DE NEURÔNIOS DA AMÍGDALA
BASOLATERAL DE RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE
ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção
do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em
Biologia e Celular e Molecular da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: 22 de Fevereiro de 2019

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Márcio Vinícius F. Donadio – PUCRS

Prof. Dr. Moisés Evandro Bauer – PUCRS

Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto - UFRGS

Porto Alegre

2019

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Silvia e Evaldo, e à minha irmã Victória pelo amor incondicional, incentivo e apoio que sempre me deram. Obrigada pelo acolhimento e ajuda nas horas difíceis. Sem vocês eu não teria conseguido!

Ao Andrei, meu namorado, que me deu apoio e esteve ao meu lado durante esta caminhada.

Às meninas do laboratório por toda a ajuda que me deram, pelas horas de descontração e risadas que tornam esses momentos especiais.

À Mari e Marina, pela ajuda nos finais de semana e horas extra trabalhadas.

Um agradecimento especial à Raquel, que além de toda a ajuda no trabalho, faz o papel de mãe no laboratório e nos conforta nos momentos difíceis.

Ao meu grande amigo e orientador, professor Léder Xavier, por todos esses anos de convivência e ensinamentos, pela disponibilidade e pela inspiração como profissional e pesquisador. Muito obrigada pelos conselhos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. Esse é só o começo de uma grande jornada!

RESUMO

A amígdala é uma das principais regiões encefálicas envolvidas no transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) e desempenha um papel importante nos circuitos neuronais de medo, ansiedade e respostas emocionais. Estudos de imagem demonstraram que a amígdala apresenta função anormal em pacientes com TEPT. Além disso, alterações na plasticidade sináptica têm sido associadas a distúrbios psiquiátricos e estudos anteriores demonstram que alterações na morfologia da amígdala, especialmente em neurônios da amígdala basolateral (BLA), estão relacionadas ao medo e à ansiedade em modelos animais de distúrbios relacionados ao estresse. Como uma parte dos indivíduos expostos a um evento traumático desenvolvem TEPT, os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos iniciais do TEPT no metabolismo da glicose na amígdala e analisar as possíveis alterações na plasticidade dos espinhos dendríticos da BLA em animais com diferentes níveis de resposta comportamental. O choque inescapável único foi utilizado como modelo experimental de TEPT e os animais foram classificados de acordo com a duração do seu comportamento de medo em grupos distintos: “*extreme behavior response*” (EBR) e “*minimal behavior response*” (MBR). Avaliamos o metabolismo basal da glicose (antes do protocolo estressor) e imediatamente após o lembrete situacional através da técnica de microPET-CT e 18F-FDG. Os espinhos dendríticos da BLA foram analisados quanto ao número, densidade, forma, morfologia e parâmetros quantitativos relacionados ao comprimento do espinho (CE), comprimento do pescoço (CP), diâmetro da cabeça (DC) e diâmetro do pescoço (DP) na mesma população. Nossos resultados mostram que os animais classificados como EBR exibiram maior comportamento de medo e um aumento na densidade dos espinhos dendríticos proximais nos neurônios da BLA. O metabolismo da glicose na amígdala, a morfologia e os parâmetros morfométricos analisados não apresentaram diferenças significativas. Nossos resultados demonstram que a resposta comportamental extrema provocada por este protocolo de TEPT pode induzir um aumento imediato na densidade de espinhos dendríticos na BLA, que não está associado com alterações na morfologia dos espinhos dendríticos, tampouco com alterações metabólicas na BLA de ratos *Wistar*.

Palavras-chave: TEPT, amígdala, espinhos dendríticos, 18F-FDG, microPET

ABSTRACT

Amygdala is one of the main regions involved in posttraumatic stress disorder (PTSD) and plays an important role in the neuronal circuits for fear and anxiety and emotional reactivities. Previous imaging research reported abnormal amygdala function in patients with PTSD. In addition, alterations in synaptic plasticity have been associated with psychiatric disorders and previous reports have indicated alterations in the amygdala morphology, especially in basolateral (BLA) neurons, are related to fear and anxiety in animal models of stress-related disorders. Since, some individuals exposed to a traumatic event develop PTSD, the goals of this study were to evaluate the early effects of PTSD on amygdala glucose metabolism and analyze the possible BLA dendritic spine plasticity in animals with different levels of behavioral response. We employed the inescapable footshock protocol as an experimental model of PTSD and the animals were classified according to the duration of their freezing behavior into distinct groups: “extreme behavioral response” (EBR) and “minimal behavioral response” (MBR). We evaluated the amygdala glucose metabolism at baseline (before the stress protocol) and immediately after the situational reminder using the microPET-CT and ¹⁸F-FDG. The BLA dendritic spines were analyzed according to their number, density, shape, morphology and quantitative parameters related to the spine length (SL), neck length (NL), head diameter (HD) and neck diameter (ND) in the same population. Our results show that animals classified as EBR exhibited longer freezing behavior and an increase in the proximal spine density of BLA neurons. Amygdala glucose metabolism, dendritic morphology and morphometric parameters showed no significant differences. Our results show that the extreme behavior response induced by this PTSD protocol can induce an early increase in BLA spine density, which is unassociated with either morphological changes in spines or metabolic changes in amygdala in Wistar rats.

Keywords: PTSD, amygdala, dendritic spines, ¹⁸F-FDG, microPET

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Desenho esquemático do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA)..... 12
- Figura 2** - Desenho ilustrando um espinho dendrítico..... 17
- Figura 3** – Desenho ilustrando a classificação dos espinhos dendríticos.....18
- Figura 1 artigo** – Linha do tempo ilustrando os procedimentos experimentais44
- Figura 2 artigo** – a) Diagrama esquemático de uma secção do encéfalo de rato demonstrando a região da amígdala basolateral (BLA) em cinza (-2.40 mm posterior ao bregma). Adaptado de Paxinos and Watson *Rat Brain Atlas* (2008). b) Imagem digitalizada demonstrando um neurônio bipenachado da BLA. c) Imagem digitalizada demonstrando um neurônio estrelado da BLA.....45
- Figura 3 artigo** – Duração do comportamento de freezing avaliado durante o lembrete situacional. Ambos os grupos EBR e MBR permaneceram maior tempo em freezing quando comparados ao grupo controle. Adicionalmente, animais do grupo EBR permaneceram em freezing por mais tempo quando comparados ao grupo MBR. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$46
- Figura 4 artigo** – a) Absorção de 18F-FDG na amígdala. Os resultados estão expressos como *standard uptake value ratio (SUVR)*. b) Imagem (*rat template*) da absorção de 18F-FDG na posição coronal (acima-direita), sagital (acima-meio) e transversa (acima-direita) e imagem (*rat template*) de microCT nas posições coronal (abaixo-esquerda), sagital (abaixo-meio) e transversa (abaixo direita). A amígdala, marcada em roxo, foi definida utilizando um *ratROI-template* baseado nas coordenadas de Paxinos e Watson.....47
- Figura 5 artigo** – Imagens digitalizadas de neurônios fluorescentes corados com Dil e reconstruídos através de microscopia confocal. Ramos dendríticos proximais representativos demonstrando espinhos pleomórficos na amígdala basolateral de ratos dos grupos controle, MBR e EBR. Amostras em maior aumento são demonstradas à direita. s=stubby; t= thin; m=mushroom; w=wide48
- Figura 6 artigo** – Valores (média \pm SEM) de a) densidade de todos os espinhos dendríticos avaliados em 40 μ m proximais. b) número de cada tipo de espinho dendrítico avaliado em 40 μ m proximais nos neurônios da BLA * $p \leq 0.05$49
- Figura 7 artigo** – Dados morfométricos (média \pm SEM) em relação a a) comprimento do espinho, b) diâmetro da cabeça, c) comprimento do pescoço e d) diâmetro do pescoço

avaliados em μm nos diferentes tipos de espinhos na BLA em cada grupo experimental.
Imagens à direita exemplificam cada parâmetro morfológico
mensurado.....50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹⁸F-FDG - 18F-fluorodeoxoglicose

ACTH - Hormônio adrenocorticotrópico

BLA – Amígdala basolateral

CE – Comprimento do espinho

CIU - Choque inescapável único

CP – Comprimento do pescoço

CRH - Hormônio liberador de corticotrofina

DC- Diâmetro da cabeça

DP- Diâmetro do pescoço

DSM-5 – Diagnóstico e estatística para transtornos mentais

EBR – Resposta comportamental extrema – “*extreme behavioral response*”

F-actin – Filamentos de actina

G-actin – Actina globular

GFAP - Proteína glial fibrilar ácida

GR - Receptor de glicocorticoide

HPA - Hipotálamo-hipófise-adrenal

LTD - Depressão de longa duração

LTP - Potenciação de longa duração

MBR - Resposta comportamental mínima – “*minimal behavioral response*”

microPET-CT - Tomografia por emissão de pósitrons em pequenos animais

MR - Receptor mineralocorticoide

PBR – Resposta comportamental parcial – “*partial behavioral response*”

PET - Tomografia por emissão de pósitrons

PFC - Córtex pré-frontal

PSD - Densidade pós-sináptica

PTSD – *Posttraumatic stress disorder*

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNC - Sistema nervoso central

SNS - Sistema nervoso simpático

TEPT - Transtorno de estresse pós-traumático

SUMÁRIO

Capítulo I

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 ESTRESSE	11
1.2 O TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO (TEPT).....	13
1.3 RELAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM HUMANOS E EM MODELOS ANIMAIS DE TEPT.....	14
1.4 PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE TEPT EM ROEDORES	15
1.5 RELAÇÃO ENTRE O TEPT E A AMÍGDALA.....	16
1.6 TEPT E ESPINHOS DENDRÍTICOS.....	17
1.7 MICRO TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE PÓSITRONS (MICRO PET-CT)	19
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	23
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
REFERÊNCIAS	54
ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	62

Capítulo I

Introdução

Justificativa

Objetivos

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTRESSE

O conceito de estresse na fisiologia surgiu em 1936 quando Hans Selye o definiu como “a resposta não específica do corpo a qualquer demanda física”. Segundo Selye, estressores são definidos como desafios específicos que causam a resposta fisiológica ao estresse (Selye, 1936), podendo ser classificados como físicos, psicológicos, ou sociais (Bartolomucci, 2007).

Estressores agudos são capazes de gerar respostas fisiológicas e comportamentais adaptativas, no intuito de reestabelecer a homeostase do organismo. Entretanto, a exposição repetida ou crônica a esses estressores pode resultar em alterações inadequadas dos sistemas biológicos (Reber, 2012; Sapolsky et al., 1986b; Dhabhar and McEwen, 1996; McEwen and Seeman, 1999; Dhabhar, 2002; McEwen, 2004).

As respostas neuroendócrinas após um estímulo estressor são consideradas importantes mecanismos de sobrevivência do organismo. A percepção de um estressor ocasiona a ativação do sistema nervoso simpático (SNS) que, de forma rápida, libera adrenalina para a circulação sanguínea através da porção medular da suprarrenal (Reber 2012). Níveis elevados de adrenalina na circulação têm como resultado a mobilização de energia para manter as funções encefálicas e musculares, a atenção aguçada e focada da ameaça percebida, o aumento das taxas de perfusão encefálica e da utilização da glicose encefálica, o aumento da função cardiovascular e da respiração, a redistribuição do fluxo sanguíneo, a diminuição do apetite, entre outros (Carrasco e Van de Kar 2003).

A percepção de um estressor pelo encéfalo também leva a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Quando uma ameaça é percebida, o hipotálamo produz o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que interage com a adenohipófise, levando à secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). O ACTH, por sua vez, estimula a glândula adrenal a produzir glicocorticóides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) (Raymond et al, 2017). A atividade do eixo HPA é regulada por feedbacks negativos, no qual os glicocorticóides regulam a liberação de ACTH e CRH. Uma vez que o estressor percebido diminui, o feedback negativo é desencadeado para “desligar” o eixo HPA e retornar ao ponto homeostático (Lupien et al, 2009) (Fig1).

Efeitos relacionados ao estresse são encontrados no sistema nervoso central (SNC), como alterações nos neurotransmissores, na plasticidade sináptica, na atividade neuronal e na morfologia das células, o que pode influenciar em funções cognitivas como aprendizagem e memória (Kim et al., 2015). Ademais, sabe-se que os glicocorticoides, quando expostos de forma prolongada ao organismo, podem desencadear prejuízos fisiológicos, bem como aumentar a susceptibilidade para desenvolver doenças neuropsiquiátricas (Musazzi et al., 2010; Tsigos e Chrousos 2002).

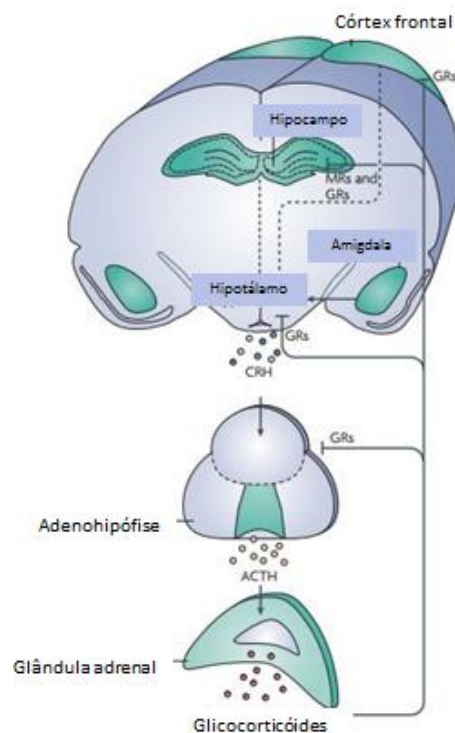


Figura 1. Desenho esquemático demonstrando o eixo HPA. (GR: receptor glicocorticoide, MR: receptor mineralocorticoide, CRH: hormônio liberador de corticotrofina, ACTH: hormônio adrenocorticotrópico) (Adaptado de Lupien et al, 2009).

Uma das formas como o organismo lida com o estresse depende das respostas do eixo HPA, do SNA, intestino, rins, sistema imune e seus biomedadores (cortisol, neurotransmissores simpáticos e parassimpáticos e citocinas). Ajustes destes sistemas biológicos podem ser adaptativos em curto prazo (alostase) ou mal adaptativos em longo prazo (carga alostática), resultando em doenças (McEwen, 2006, 2011).

1.2 O TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO (TEPT)

O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é uma condição psiquiátrica que pode se desenvolver após a exposição à um evento traumático, gerando sintomas característicos. É um transtorno classificado na categoria de “transtornos relacionados a trauma e a estressores” pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - DSM-5*). São consideradas situações traumáticas a exposição à morte ou ameaça de morte, ferimentos graves ou violência sexual. Não apenas a exposição direta ao trauma pode levar ao desenvolvimento de TEPT, mas testemunhar o evento ocorrido, vivenciar a notícia de que o evento traumático ocorreu a um familiar ou amigo próximo e a exposição extrema ou repetida aos detalhes aversivos do evento também podem constituir uma experiência traumatogênica (Liberzon et al, 2005; American PA, 2013).

O DSM-5 define ainda os critérios que devem embasar o diagnóstico de TEPT:

- 1- Revivência recorrente, involuntária e intrusiva do evento através de memórias, pesadelos e reações dissociativas (“flashbacks”);
- 2- Sofrimento psicológico intenso ou reatividade fisiológica quando o indivíduo é exposto a situações que relembram o evento traumático;
- 3- Fuga persistente de estímulos associados ao trauma como memórias, pensamentos, sentimentos, pessoas, lugares, entre outros;
- 4- Mudanças negativas na cognição e humor como amnésia dissociativa, emoções negativas, sentimento de culpa e isolamento social, perda de interesse em atividades antes prazerosas e incapacidade de sentir emoções positivas;
- 5- Aumento da irritabilidade, comportamento imprudente ou autodestrutivo, insônia e diminuição da capacidade de concentração;
- 6- Resposta exagerada ao susto e hipervigilância;

Alguns indivíduos podem apresentar, além dos critérios mencionados, um subtipo no qual são encontrados sintomas como despersonalização (sentimento de distanciamento do próprio corpo) ou desrealização (sentimento de distanciamento do mundo ao redor).

Estes sintomas devem aparecer após a ocorrência do evento traumático e persistirem por mais de um mês. Além disso, os sintomas devem causar alterações clínicas, afetando substancialmente a vida social, ocupacional e funcional do indivíduo, sem estarem associados a outros fatores como o uso de substâncias ou outra condição médica.

Dados epidemiológicos mostram que o TEPT tem uma prevalência de 1.3% a 12.2%, dependendo da população estudada. Índices maiores são encontrados entre pessoas socialmente desfavorecidas, pessoas mais jovens, mulheres, militares, policiais, bombeiros e socorristas (Karam et al, 2014; American PA, 200, 2013; Hoge et al, 2014, 2016; Shalev et al, 2017). Além disso, o TEPT tem uma alta taxa de comorbidade com outras doenças e causa uma incapacidade substancial nas esferas sociais, ocupacionais e interpessoais (Yehuda et al, 2002, Pietrzak et al, 2011, Shalev et al, 2017).

Nem todos os indivíduos expostos a eventos traumáticos desenvolvem TEPT (Kessler, 1995; Santiago, 2013). Algumas pessoas tendem a ser mais resilientes, ou seja, apesar de expostas a adversidades psicológicas ou físicas, não desenvolvem doenças (Charney, 2004). A resiliência é um processo dinâmico, que pode apresentar uma trajetória na qual a saúde mental permanece estável durante e após um evento traumático, ou ainda, consiste em distúrbios temporários que são seguidos por uma recuperação relativamente rápida e bem-sucedida (Kalisch et. al, 2015). A neurobiologia individual, bem como experiências passadas, fatores genéticos e microbioma estão entre os fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença (Heim and Nemeroff 2001; Mitra et al. 2005; Diehl et al. 2007; McEwen 2008; Adamec et al. 2012; Luczynski et al. 2016; Malan-Muller et al. 2018).

1.3 RELAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM HUMANOS E EM MODELOS ANIMAIS DE TEPT

Os modelos animais de TEPT podem gerar sintomas comportamentais que são associados aos sintomas observados em humanos, como por exemplo:

- 1- O medo condicionado ao contexto (como quando o animal é exposto a um lembrete situacional), pode representar os sintomas de revivência do trauma;
- 2- A redução da exploração verificada nos modelos animais de TEPT pode representar os sintomas de neofobia e fuga às situações relacionadas a memória aversiva;
- 3- Diminuição na resposta por recompensas e alterações no medo condicionado podem ser relacionadas com alterações emocionais e na cognição;
- 4- Um estímulo sonoro é capaz de provocar uma resposta exagerada ao susto, podendo representar o sintoma de hipervigilância;

Dentre esses sintomas, o susto e medo condicionado são, provavelmente, as analogias mais diretas e, portanto, mais extensivamente estudadas nos modelos animais de TEPT (Liberzon et al., 2005; Török et al, 2018).

1.4 PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE TEPT EM ROEDORES

Diversos modelos experimentais foram desenvolvidos a fim de mimetizar os efeitos fisiológicos, psicológicos e comportamentais encontrados em doenças relacionadas ao estresse em humanos, como o TEPT e a depressão. Os protocolos variam em intensidade, duração e tipo de estressor, sendo uma ferramenta necessária para compreender os mecanismos neurais e biológicos envolvidos, os aspectos que contribuem para o desenvolvimento das patologias, bem como o desenvolvimento de possíveis compostos terapêuticos. Os modelos de estresse em roedores utilizam estressores fisiológicos ou psicológicos, podendo ser de exposição breve a um estressor agudo ou a uma sucessão de diferentes estímulos estressores durante semanas, caracterizando assim o estresse crônico (Schoner et al, 2017; Borghans and Homberg, 2015).

Dentre os modelos experimentais de estresse mais utilizados na pesquisa estão a sensibilização dependente do tempo (Antelman, 1998), trauma subaquático (Richter-levin, 1998), estresse de restrição e estresse prolongado único (Liberzon, 1997), estresse baseado em predadores (Blanchard 1998), estresse na infância (Kalinichev, 2002), estresse social (Pizarro, 2004), isolamento (Kim JW, 1996), suspensão pela cauda (Steru, 1985), e choque nas patas (Van Dijken HH, 1992) (Schoner et al, 2017; Borghans & Homberg, 2015).

O choque elétrico nas patas é um estressor que possui componentes físicos e emocionais, que consiste em choques de intensidade e duração variáveis e controladas em um aparato com piso composto de barras eletrificadas. Este modelo estressor é capaz de gerar alterações comportamentais e neuroquímicas que refletem sintomas de doenças relacionadas ao estresse em humanos (Bali & Jaggi, 2015). Nesse aspecto, o modelo específico de choque inescapável único (CIU) é um protocolo de estresse traumático, no qual os roedores são submetidos a um único episódio de choque nas patas, onde não há possibilidade de escapar (Liberzon et al., 2005). Esse protocolo gera sintomas que estão associados a distúrbios relacionados ao medo e ansiedade, porém não afeta todos os roedores (Saur, 2017).

Após o protocolo de CIU, estudos constataram o aumento da ansiedade (Diehl et al., 2007) e do medo condicionado ao contexto (Maier 1990, Diehl et al., 2007), o aumento da neofobia (Job e Barnes 1995), a redução da interação social (Short e Maier 1993), a diminuição no comportamento exploratório e a diminuição do consumo de alimentos

saborosos (Griffiths et al., 1992, Krolow et al., 2013), demonstrando assim que esse protocolo é capaz de produzir alterações sobre o comportamento e a fisiologia dos animais.

Tendo em vista que o protocolo do CIU gera diferentes graus de resposta comportamental nos roedores (Saur, 2017), este protocolo torna-se um excelente modelo para avaliar as bases metabólicas e morfofisiológicas em um modelo animal de TEPT.

1.5 RELAÇÃO ENTRE O TEPT E A AMÍGDALA

O encéfalo está envolvido nas respostas ao estresse, de forma a determinar o que é considerado uma ameaça, regular as respostas fisiológicas, comportamentais, cognitivas e emocionais, além de alterar sua plasticidade de uma forma adaptativa ou mal adaptativa frente a estímulos estressores (McEwen, 2011).

A amígdala é uma das principais regiões envolvidas no TEPT e estudos demonstram que a responsividade da amígdala parece ser positivamente correlacionada com os sintomas do TEPT (Akshaya et al, 2017; Tovote et al. 2015).

Essa região faz parte do sistema límbico e apresenta fundamental importância na memória emocional (Han et al., 2014; Harding et al., 2002; Fenster et al. 2018). Estudos comprovam que a amígdala está associada ao circuito neural do estresse e está envolvida na codificação e recuperação das memórias de medo condicionado, bem como na modulação dos comportamentos de ansiedade (Shekhar et al., 2005; Ebner et al., 2004; Carter et al., 2004; Davis 2006; Roozendaal e McGaugh 1996).

Estudos morfométricos em humanos com TEPT apresentaram resultados distintos em relação ao volume da amígdala. Foram encontrados aumento (Kuo et al., 2012), diminuição (Weninger et al., 2008; Morey et al., 2012) ou nenhuma alteração (Bremner et al., 1997; Lindauer et al., 2004; Lindauer et al., 2005; Schmahl et al., 2009). Ademais, Veer e colaboradores (2015) constataram uma diminuição (que pode ser originada nos núcleos basolateral e medial da amígdala) apenas no volume da amígdala direita de pacientes com TEPT. Em veteranos de guerra, um estudo sugeriu que essa redução do volume da amígdala direita estaria relacionada aos sintomas de ansiedade e excitação nesses indivíduos (Pietrzak et al., 2015). Além disso, quando pacientes com TEPT foram expostos a apresentações visuais ou auditivas relacionadas ao trauma, houve um aumento no fluxo sanguíneo na amígdala, indicando uma hiperresponsividade dessa região nesses pacientes (Liberzon et al, 1999; Shin et al., 2004b).

Em relação ao metabolismo da glicose em humanos e em modelos animais de TEPT, os dados são paradoxais. Por exemplo, foi relatado aumento (Yehuda et al., 2009; Ramage et

al., 2016; Zhu et al., 2016), diminuição (Buchsbaum et al., 2015; Stocker et al., 2014; Yehuda et al., 2009) e nenhuma alteração (Molina et al., 2010; Saur et al., 2017) no metabolismo da glicose em diferentes núcleos da amígdala.

1.6 TEPT E ESPINHOS DENDRÍTICOS

Há mais de um século atrás, Santiago Ramón y Cajal demonstrou a existência de pequenas protusões que cobriam os dendritos das células de Purkinje no cerebelo, denominando-as de espinhos dendríticos. Ele revelou que estes espinhos serviam para aumentar a área superficial dos dendritos, aumentando assim sua capacidade de receber impulsos sinápticos. Ademais, demonstrou que estavam presentes em várias regiões encefálicas e subtipos neuronais, além de serem relativamente consistentes entre as espécies (Ramón y Cajal 1888, 1899, Gipson & Olive, 2017).

Os espinhos dendríticos são estruturas especializadas de conectividade neuronal e sinalização no sistema nervoso, sendo estruturas altamente dinâmicas e com alta plasticidade, podendo alterar sua morfologia, número, densidade e motilidade em prazos relativamente curtos. Em relação a sua estrutura, geralmente consistem de uma cabeça (que recebe principalmente estímulos sinápticos excitatórios), ligada a um pescoço que emana do eixo do dendrito, podendo haver mais de 100.000 espinhos dendríticos em um único neurônio (Harris & Spacek, 2016; Yuste, 2010; Gipson & Olive, 2017) (Fig. 2).

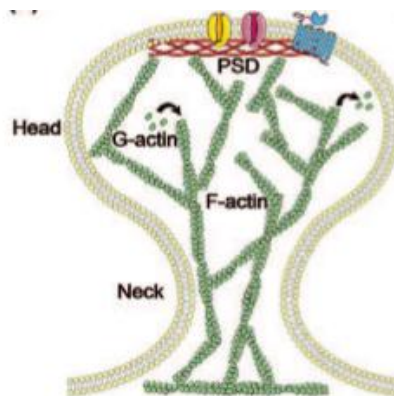


Figura 2. Desenho ilustrando um espinho dendrítico. A cabeça e o pescoço são formadas por citoesqueleto de actina, que remodela o espinho durante a plasticidade sináptica. Na densidade pós-sináptica (PSD), receptores ionotrópicos e metabotrópicos são continuamente inseridos ou retraídos (Retirado de Gipson & Olive, 2017).

Com base na sua morfologia, os espinhos podem ser classificados em: 1) Filopódio (não apresenta cabeça definida, é fino e comprido, considerado uma forma ‘imatura’); 2) Fino (apresenta pescoço fino e pode não ter uma cabeça bem definida); 3) Achatado/espesso (não apresenta pescoço diferenciado e se mostra como uma elevação a partir do contorno

dendrítico); 4) do tipo “cogumelo” (como se desprende da sua nomenclatura e que parece ser o espinho mais estável em termos de mudanças numéricas e contatos sinápticos duradouros) e 5) Ramificado (um pescoço pode dar origem a mais de uma cabeça de espinho) (Hering; Sheng, 2001; Marcuzzo, 2006, Fig.3).

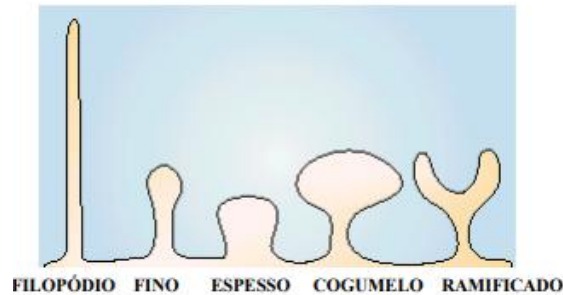


Figura 3. Desenho esquemático demonstrando as diferentes classificações dos espinhos dendríticos baseados na sua morfologia (adaptado de Hering & Sheng, 2001 e reproduzida de Marcuzzo, 2006).

Além disso, o formato e o tamanho dos espinhos também possuem influência na conectividade neuronal. Espinhos finos são menores, representam estruturas plásticas e são considerados “espinhos de aprendizagem”, enquanto espinhos do tipo cogumelo são mais estáveis, possuem uma maior densidade pós-sináptica e estão associados com sinapses mais fortes (Bourne & Harris, 2007; Sousa, 2012; Leuner and Shors, 2012).

Estímulos internos ou externos podem influenciar a densidade e a morfologia dos espinhos dendríticos (Radley, 2008; Mitra, 2005). O fortalecimento sináptico e a potenciação de longa duração (do inglês: *long-term potentiation*, ou LTP) estão associados a um aumento na densidade dos espinhos e/ou aumento no diâmetro da cabeça dos espinhos, enquanto o enfraquecimento sináptico induzido pela depressão de longa duração (do inglês: *long-term depression*, ou LTD) se associa com a retração dos mesmos. (Alvarez and Sabatini, 2007; Roo, 2008a; Sala and Segal, 2014; Segal, 2005; van der Zee, 2015; Nagerl et al. 2004; Oh et al. 2013; Wang et al. 2007; Zhou et al. 2004; Gipson & Olive, 2017). Ademais, o número de espinhos por segmento dendrítico (densidade por μm dendrítico) tem servido para estimar a maior ou menor ocorrência de sinapses (Woolley; McEwen, 1993).

Estudos recentes têm demonstrado que alterações na função sináptica (liberação de glutamato, transmissão/plasticidade sináptica) e na neuroarquitetura (morfologia e densidade de espinhos dendríticos) estão intimamente relacionadas a doenças relacionadas ao estresse, incluindo o TEPT (Patel, 2018; Ross, 2018; Musazzi, 2018; Csabai, 2018; Zhang, 2018; Shu,

2017; Dong, 2018). Além disso, alterações na morfologia da amígdala basolateral (BLA) estão relacionadas ao medo e à ansiedade em modelos animais de distúrbios de estresse (Mitra et al, 2009; Adamec et al, 2012).

Dessa forma, o estudo dos espinhos dendríticos pode fornecer evidências sobre as bases morfológicas, estruturais e funcionais do SNC sob diferentes condições experimentais, inclusive em patologias como o TEPT.

1.7 MICRO TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE PÓSITRONS (MICRO PET-CT)

A tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET) é uma técnica de medicina nuclear não invasiva que permite analisar processos fisiológicos e bioquímicos *in vivo*. A tomografia por emissão de pósitrons em pequenos animais (microPET-CT) funciona da mesma maneira que a PET com alta resolução, com voxel de aproximadamente 1mm³, e sua utilização fornece dados acerca da quantificação dos processos fisiológicos e bioquímicos no organismo vivo, tendo significativa importância em estudos pré-clínicos de doenças neurodegenerativas e distúrbios neuropsiquiátricos (Virdee et al., 2012; Lancelot e Zimmer 2010).

A microPET utiliza traçadores conjugados com radionuclídeos emissores de pósitrons, formando os radio-traçadores. Os radio-traçadores são administrados intravenosamente e seguem a distribuição normal da molécula marcada acumulando-se em diferentes áreas do corpo de acordo com sua farmacodinâmica. A atividade metabólica das regiões anatômicas em animais de pequeno porte é mapeada através do microPET-CT com a utilização de 18F-fluorodeoxoglicose (¹⁸F-FDG). A FDG é uma molécula análoga de glicose e seu uso como marcador metabólico permite identificar a distribuição da sua captação em diferentes regiões encefálicas de roedores *in vivo* (Virdee et al., 2012; Lancelot e Zimmer 2010; Baptista et al., 2015).

Assim, essa técnica diminui a quantidade de animais necessários para a pesquisa, pois permite desenvolver estudos longitudinais com o mesmo animal. Dessa forma, cada animal serve como seu próprio controle, sendo relevante o uso do microPET para estudos que objetivam comparar o metabolismo de um mesmo animal, anteriormente e posteriormente aos protocolos experimentais.

2 JUSTIFICATIVA

A forma como o organismo responde ao estresse varia entre os indivíduos, enquanto alguns são mais vulneráveis a desenvolver doenças neuropsicológicas, outros possuem uma maior resiliência. Estima-se que em toda a população mundial, uma porcentagem de 50% a 90% sofrerá exposição a algum evento traumático durante sua vida (Chang et al., 2017; Kessler et al., 1995; Breslau et al., 1998) e que aproximadamente 7 a 8% dessas pessoas desenvolverão doenças como o TEPT (Chang et al., 2017; Kessler et al., 1995).

O contexto da atual vida urbana, associado ao crescimento da violência, aumento dos assaltos e sequestros e da alta taxa de acidentes automobilísticos, promove um ambiente favorável para o desenvolvimento de doenças associadas ao estresse. Dessa maneira, conhecer as bases metabólicas e morfofisiológicas que estão potencialmente envolvidas na resiliência ou susceptibilidade pode abrir caminhos para identificar os fatores de risco biológicos que tornam determinados indivíduos especialmente vulneráveis a transtornos relacionados ao estresse, bem como aprimorar métodos de prevenção e tratamento de distúrbios neuropsiquiátricos como o TEPT.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo avaliar as possíveis alterações metabólicas e morfofuncionais da amígdala de ratos Wistar submetidos ao protocolo de estresse pós-traumático (TEPT).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

No intuito de alcançar o objetivo geral foram realizados no presente estudo:

- a) A indução do estresse através do choque inescapável único (CIU) e separação dos grupos em: “*Minimal behavior response*” (MBR) ou “*Extreme behavior response*” (EBR), de acordo com a duração do tempo de *freezing* dos animais;
- b) Análise do metabolismo de glicose da amígdala com uso da técnica de microPET-CT, com ¹⁸F-FDG como marcador metabólico;
- c) Avaliação da densidade, morfologia e parâmetros quantitativos dos espinhos dendríticos na região da amígdala basolateral (BLA).

Capítulo II

Artigo Científico

4 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico foi submetido ao periódico “*Brain Structure and Function*”, FI: 4.231, em 15 de janeiro de 2019.

BSAF-D-19-00022 - Submission Notification to co-author



em.bsaf.0.609e6f.853b2170@editorialmanager.com em nome de Brain Structure &



Responder a todos | v

Hoje, 18:05

Laura Tartari Neves v

Re: "PTSD increases spine density in basolateral amygdala neurons of Wistar rats without metabolic changes"

Full author list: Laura Tartari Neves, MSc student; Paula Fernanda Ribas Neves, Msc student; Lisié Valéria Paz, MSc student; Mariana Zancan, Phd student; Bruna Bueno Milanesi, Graduate student; Gabriele Zenato Lazzari, Graduate student; Rafaela Barboza da Silva, Graduate student; Marina Mena Barreto Peres de Oliveira, Graduate student; Gianina Teribele Venturin, PhD; Samuel Greggio, PhD; Jaderson Costa da Costa, PhD; Alberto A. Rasia-Filho, PhD; Régis Gemerasca Mestriner, PhD; Leder Leal Xavier, PhD

Dear Miss Neves,

We have received the submission entitled: "PTSD increases spine density in basolateral amygdala neurons of Wistar rats without metabolic changes" for possible publication in Brain Structure and Function, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dr. Leder Leal Xavier who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Brain Structure and Function

PTSD increases spine density in basolateral amygdala neurons of Wistar rats without metabolic changes

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:							
Full Title:	PTSD increases spine density in basolateral amygdala neurons of Wistar rats without metabolic changes						
Article Type:	Original Article						
Keywords:	PTSD; amygdala; dendritic spines; 18F-FDG; microPET						
Corresponding Author:	Leder Leal Xavier, PhD Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul BRAZIL						
Corresponding Author Secondary Information:							
Corresponding Author's Institution:	Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul						
Corresponding Author's Secondary Institution:							
First Author:	Laura Tartari Neves, MSc student						
First Author Secondary Information:							
Order of Authors:	Laura Tartari Neves, MSc student Paula Fernanda Ribas Neves, Msc student Lisiê Valéria Paz, MSc student Mariana Zancan, Phd student Bruna Bueno Milanesi, Graduate student Gabriele Zenato Lazzari, Graduate student Rafaela Barboza da Silva, Graduate student Marina Mena Barreto Peres de Oliveira, Graduate student Gianina Teribele Venturin, PhD Samuel Greggio, PhD Jaderson Costa da Costa, PhD Alberto A. Rasia-Filho, PhD Régis Gemerasca Mestriner, PhD Leder Leal Xavier, PhD						
Order of Authors Secondary Information:							
Funding Information:	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 60%;">Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (30664420169)</td> <td>Dr. Leder Leal Xavier</td> </tr> <tr> <td>Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (001)</td> <td>Miss Laura Tartari Neves</td> </tr> <tr> <td>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (04/1037.1)</td> <td>Dr. Leder Leal Xavier</td> </tr> </table>	Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (30664420169)	Dr. Leder Leal Xavier	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (001)	Miss Laura Tartari Neves	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (04/1037.1)	Dr. Leder Leal Xavier
Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (30664420169)	Dr. Leder Leal Xavier						
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (001)	Miss Laura Tartari Neves						
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (04/1037.1)	Dr. Leder Leal Xavier						
Abstract:	Imaging studies have shown abnormal amygdala function in patients with posttraumatic stress disorder (PTSD). In addition, alterations in synaptic plasticity have been associated with psychiatric disorders and previous reports have indicated						

	<p>alterations in the amygdala morphology, especially in basolateral (BLA) neurons, are associated to stress-related disorders. Since, some individuals exposed to a traumatic event develop PTSD, the goals of this study were to evaluate the early effects of PTSD on amygdala glucose metabolism and analyze the possible BLA dendritic spine plasticity in animals with different levels of behavioral response. We employed the inescapable footshock protocol as an experimental model of PTSD and the animals were classified according to the duration of their freezing behavior into distinct groups: "extreme behavioral response" (EBR) and "minimal behavioral response" (MBR). We evaluated the amygdala glucose metabolism at baseline (before the stress protocol) and immediately after the situational reminder using the microPET and the radiopharmaceutical 18F-FDG. The BLA dendritic spines were analyzed according to their number, density, shape, morphology and morphometric parameters. Our results show that animals classified as EBR exhibited longer freezing behavior and an increase in the proximal spine density of BLA neurons. Amygdala glucose metabolism, dendritic morphology and morphometric parameters showed no significant differences. Our results show that the extreme behavior response induced by this PTSD protocol can induce an early increase in BLA spine density, which is unassociated with either morphological changes in spines or metabolic changes in Wistar rats.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Hagit Cohen, Phd Professor, Ben-Gurion University of the Negev Faculty of Health Sciences hagitc@bgu.ac.il Dr.Cohen is an expert in dendritic spines and PTSD</p> <p>Stephen Heinrichs, Phd Professor, Boston College stephen.heinrichs@bc.edu Dr. Heinrichs is an expert in dendritic spines and amígdala</p> <p>Carlos Alexandre Netto, Phd Professor, Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciencias Basicas da Saude netto@gabinete.ufrgs.br Dr.Netto is an expert in behavioral neuroscience</p> <p>Rupshi Mitra, Phd Professor, Nanyang Technological University rmitra@ntu.edu.sg Dr.Mitra is an expert in dendritic spines and BLA</p>
Opposed Reviewers:	

PTSD increases spine density in basolateral amygdala neurons of Wistar rats without metabolic changes

Laura Tartari Neves^{1,2}, Paula Fernanda Ribas Neves^{1,2}, Lisiê Valéria Paz¹, Mariana Zancan⁴, Bruna Bueno Milanesi¹, Gabriele Zenato Lazzari¹, Rafaela Barboza da Silva¹, Marina Mena Barreto Peres de Oliveira¹, Gianina Teribele Venturin³, Samuel Greggio³, Jaderson Costa da Costa³, Alberto A. Rasia-Filho⁴, Régis Gemerasca Mestriner^{1,2}, Léder Leal Xavier^{1,2}

¹Cell and Tissue Biology Laboratory, School of Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil

²Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil

³Brain Institute of Rio Grande do Sul (BraIns), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil

⁴Department of Basic Sciences/Physiology, Universidade Federal de Ciências da Saúde, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author at: Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Escola de Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Av. Ipiranga 6681, Prédio 12C, Sala 104. CEP 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: llxavier@pucrs.br (Léder Leal Xavier)

Abstract

Imaging studies have shown abnormal amygdala function in patients with posttraumatic stress disorder (PTSD). In addition, alterations in synaptic plasticity have been associated with psychiatric disorders and previous reports have indicated alterations in the amygdala morphology, especially in basolateral (BLA) neurons, are associated to stress-related disorders. Since, some individuals exposed to a traumatic event develop PTSD, the goals of this study were to evaluate the early effects of PTSD on amygdala glucose metabolism and analyze the possible BLA dendritic spine plasticity in animals with different levels of behavioral response. We employed the inescapable footshock protocol as an experimental model of PTSD and the animals were classified according to the duration of their freezing behavior into distinct groups: “extreme behavioral response” (EBR) and “minimal behavioral response” (MBR). We evaluated the amygdala glucose metabolism at baseline (before the stress protocol) and immediately after the situational reminder using the microPET-CT and 18F-FDG. The BLA dendritic spines were analyzed according to their number, density, shape, morphology and morphometric parameters. Our results show that animals classified as EBR exhibited longer freezing behavior and an increase in the proximal spine density of BLA neurons. Amygdala glucose metabolism, dendritic morphology and morphometric parameters showed no significant differences. Our results show that the extreme behavior response induced by this PTSD protocol can induce an early increase in BLA spine density, which is unassociated with either morphological changes in spines or metabolic changes in amygdala in Wistar rats.

Keywords: PTSD, amygdala, dendritic spines, 18F-FDG

Introduction

According to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5), Posttraumatic stress disorder (PTSD) is a psychiatric condition classified in the “Trauma and Stressor-Related Disorders” category (American PA 2013). PTSD is a debilitating disorder that develops after exposure to a traumatic event which involves threatened death, serious injury or sexual violence. The psychophysiological symptoms of PTSD are associated with the traumatic event and include avoidance, negative thoughts and mood and alterations in arousal and reactivity. These symptoms persist more than a month and cause significant impairment in patients’ lives (American PA 2013; Shalev et al. 2017). In addition, DSM-5 recognizes a dissociative subtype of PTSD, where patients present depersonalization and derealization in addition to the other classical symptoms.

Epidemiological studies show a high prevalence of traumatic exposure in individuals over a lifetime (Kessler et al. 1995; Benjet et al. 2016), and some individuals, when confronted with severe traumatic events, develop PTSD (Kessler et al. 1995; Yehuda et al. 2015).

As in humans, animals also demonstrate individual differences in their response following stress. Animals submitted to the same protocol may show higher or lower levels of response to stress (Cohen et al. 2003, 2004; Bush et al. 2007). Thus, some studies have classified animals into distinct groups according to their behavior: animals that exhibit higher levels of stress and anxiety were classified as “EBR – extreme behavioral response” and those with lower responses were classified as “MBR – minimal behavioral response” (Cohen et al. 2014; Saur et al. 2017).

Amygdala is one of the main regions involved in PTSD and plays an important role in the neuronal circuits involved in fear, anxiety and emotional reactions (Tovote et al. 2015; Fenster et al. 2018). Indeed, some imaging studies reported abnormal amygdala function in patients with PTSD, showing an increase in amygdala response in these patients (Rauch et al. 2000; Shin et al. 2005).

The microPET-CT combined with ¹⁸F-FDG, a metabolic analogue glucose marker, is a non-invasive imaging technique widely used in both patients and rodent models of PTSD studies, which allows the quantification of encephalic glucose metabolism (Yehuda et al. 2009; Lancelot and Zimmer 2010; Virdee et al. 2012; Zhu et al. 2016; Saur et al. 2017).

Evaluating the glucose metabolism at different moments of PTSD, such as during the traumatic event and when this event is remembered is a difficult task, thus, microPET-CT and 18F-FDG can be useful to evaluate the activity of the amygdala at these different moments.

Recent studies involving acute, subacute or chronic stress models have reported alterations in the synaptic function and neuroarchitecture that are associated to stress-related disorders (Shu and Xu 2017; Musazzi et al. 2018; Patel et al. 2018; Zhang et al. 2018). In addition, alterations in the morphology of the basolateral amygdala (BLA) neurons were found to be related to fear and anxiety in animal models (Vyas et al. 2002, 2004; Mitra and Sapolsky 2008; Mitra et al. 2009).

Dendritic spines are highly plastic and can change their number, density and morphology in a relatively short time, according to different stimuli (Gipson and Olive 2017). These changes in spine density can affect synaptic function, since the number of spines is thought to be related to neuronal connectivity and excitability. In addition, the shape and size of the spines might also influence the neuronal connections, since thin spines are smaller, transient and considered “learning spines” whereas mushroom spines have more stability, greater postsynaptic density and are associated with stronger synapses (Bourne and Harris 2007; Leuner and Shors 2013). Ramified spines can have functional microdomains in the same spine, while atypical spines represent transient forms at different stages of development (Chen and Sabatini 2012; Zancan et al. 2018).

The aim of our study was to evaluate the early effects of PTSD on amygdala glucose metabolism using micro PET-CT and 18F-FDG and to analyze the number, density, shape, morphology and morphometric parameters of the BLA dendritic spines in the same population. For this purpose, we used the inescapable footshock protocol as an experimental model of PTSD and the animals were classified according to their individual behavioral response (duration of freezing behavior) into distinct groups: “extreme behavioral response” (EBR) and “minimal behavioral response” (MBR).

Material and Methods

Animals

Twenty-nine male, 3-month old Wistar rats were obtained from the Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CEMBE) of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) and kept in standard laboratory conditions in the University's facilities, with food and water *ad libitum* and a 12h light/dark cycle. Animals were divided into three groups, according to a previously defined behavioral criterion: 1- Control (n=7); 2- Minimal Behavioral Response (MBR, n=10) and 3- Extreme Behavioral Response (EBR, n=12). All experiments involving animals were approved by the University's ethical committee (CEUA 8481/PUCRS) and were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by the National Institute of Health (USA). All efforts were made to minimize animal suffering and the number of animals needed.

Experimental model of PTSD (single inescapable footshock)

The experimental model used in this study was based on previous research by Saur et al, 2017 (Saur et al. 2017). Briefly, a single inescapable footshock was used to induce an experimental model of PTSD. For the experiment, animals were individually placed in an apparatus which consists of a 50x25x25 cm box with a bronze grid floor. The animals were permitted to explore the apparatus for 2 minutes prior to receiving a 20-second, 1 mA 60Hz footshock. Animals in the control group were also placed in the apparatus but did not receive the footshock. This experimental model of PTSD is capable of generating symptoms that are associated with disturbances related to fear and anxiety, but does not affect all rodents equally.

Situational reminder (SR) and group division

One week after the protocol (Fig.1), animals were exposed to the situational reminder (SR) to evaluate the duration of freezing behavior, which is a measure of conditioned fear. To achieve this goal, animals were again placed in the same apparatus, but no shock was delivered. Two experienced researchers observed the animals in the apparatus for 2 minutes and measured the amount of time each animal exhibited freezing behavior. The animals were divided into three groups, according to the same cut-off behavioral criterion described by Saur et al, 2017 (Saur et al. 2017). They were classified in Extreme behavioral response (EBR),

Minimal behavioral response (MBR) or Control, according to the treatment and *freezing* period.

18F-FDG MicroPET scan

All the animals from the three experimental groups (EBR n=12, MBR n=10 and CTL n=7) were submitted to microPET /18F-FDG scanning at two different time points: On the first day of the experiments, to evaluate their basal metabolic activity in the amygdala, and on day 9, immediately after the SR (Fig.1). The microPET scanning procedure has been previously described in detail in other studies by our group (Baptista et al. 2015; Saur et al. 2017). Initially, each animal received an injection of 18F-FDG (1 mCi, i.p.) with no anesthesia and, immediately after, they were submitted to the SR to evaluate the freezing behavior. Thereby, the encephalic uptake of the tracer occurred during the performance of the behavioral test. After the SR, the animals were returned to the home cage for an additional 30 minutes to finalize the tracer uptake. After the uptake period, the animals were scanned over a period of 40 minutes, during which they were kept under inhalatory anesthesia (3-4% isoflurane and medical oxygen, and 2–3 % maintenance dose) and the body temperature was maintained at 36°C. We evaluated the 18F-FDG uptake in the amygdala and the results were expressed as the standard uptake value ratio (SUVR).

Euthanasia and Histological procedures

On day 10 (Fig.1), after the experiments, the animals were deeply anesthetized with sodium thiopental (100mg/kg) and lidocaine (4mg/kg) (i.p.) and transcardiac perfusion was performed using a peristaltic pump after an injection of 1 ml of heparin in the left ventricle of the animals. 250 ml of 1.5% formaldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) were perfused in each animal and the brains were gently removed from the skull and kept for one hour in the same fixative solution. Coronal brain sections (200 µm) of the basolateral amygdala (BLA) (Bregma-2.04mm to Bregma -2.76, Paxinos & Watson 2008, Fig.2a) were obtained using a vibrating microtome (VT 1000S, Leica, Germany). Fine-powdered fluorescent carbocyanine dye Dil (Molecular Probes, USA) was applied to the slices with the tip of a fine needle. Then the slices were covered with PBS and remained for 20 hours at room temperature (RT) to diffuse the Dil. 4% formaldehyde solution was used to postfix the slices during 30 min prior to being washed with PB. The slides were mounted with "Fluoromount G" ("antifading medium solution", refractive index = 1.4, Electron Microscopy, Sciences,

USA) and the images were acquired within the following week (Brusco et al. 2010; Rasia-Filho 2010; Zancan et al. 2018).

Image acquisition

3D images of the neurons and their proximal dendritic spines were obtained from 6 rats per group using a confocal microscope (Leica TCS SP8, Germany) with a plan apochromatic 63×/1.4 water-immersion objective lens. Spectral detectors were adjusted to capture 555 nm wavelength laser emissions. The z-stack acquisition was performed at 0.1 μm using a resolution of 1,024 × 1,024 pixels, providing a voxel size of approximately 55 × 55 × 300 nm (Brusco et al. 2010; Zancan et al. 2018). Neurons were randomly selected for the study and had to follow several criteria such as: being within the boundaries of BLA and near the middle third of the section; have at least 40μm length dendrites; have high quality fluorescent dendrites and spines with well-defined borders and be relatively isolated from other cells to avoid “tangled” dendrites (Zancan et al. 2018). Both bitufted (Fig.2b) and stellate (Fig.2c) neurons fulfilling the inclusion criteria for further study were randomly chosen. From our samples, between 5 and 17 neurons per rat from each experimental group were analyzed, with one dendrite per neuron being imaged and the dendritic spines counted, classified and measured along the first 40μm of each dendrite. Some neurons were also studied even if their cell body could not be identified as bitufted or stellate due to overlapped images. Mean values were calculated for each rat prior to groups comparisons.

Histological analysis

The images were analyzed using the Image Pro Plus 6.0 software. Data were collected on the morphology, density and morphometry of each spine (Rasia-Filho et al. 2004; de Castilhos et al. 2008; Zancan et al. 2017, 2018). Each acquired sequence of z stacks was summed and aligned to compose 3D images. The same sampling density for pixel size and z-step advance and the same image acquisition procedures were performed for all experimental groups (Heck et al. 2012; Zancan et al. 2018). To analyze the spine shape and density, the images were enhanced by 200x and each spine was classified and counted by an experienced researcher. Morphological criteria based on the spine length (SL), neck length (NL), neck diameter (ND), head diameter (HD) and the number of protrusions from a single stalk were used to classify the spines in: (a) thin (when $SL > HD$ and $HD > ND$), (b) mushroom-like ($HD \gg ND$), (c) stubby/wide ($HD > SL$), (d) ramified (with a single stalk that branches in two heads) or (e) atypical (when showing a transitional aspect between classes or an unusual

shape not classified in the other classes (Harris et al. 1992; Arellano et al. 2007; Brusco et al. 2010, 2014; Stewart et al. 2014; Dall'Oglio et al. 2015; Zancan et al. 2017, 2018). The spine density was calculated as the total number of spines (including all spine types) divided by the length of the dendrite studied. In addition, the number of each spine type was counted. Morphometric data (measured in micrometers) about the SL, NL, ND and HD were also obtained after further enhancing the 3D reconstructed images by 400x (Rasia-Filho et al. 2004; Zancan et al. 2018).

Statistical analysis

The data regarding the dendritic spines and the 18F-FDG were first submitted to a two-way ANOVA test to compare the experimental groups, brain hemispheres and the interaction of these factors. Since no difference was found for the effect of hemispherical laterality or the interaction between factors, results from the right and left amygdala were pooled together and compared between groups. Thus, the data were analyzed using one-way ANOVA for the behavior test (freezing time), for the spine density, number of each spine type per group and their corresponding morphometric values. One-way ANOVA for repeated measures was used for the 18F-FDG analysis to evaluate interactions between the groups at two different time points. All analyses were followed by Tukey's *post hoc* test and performed using the GraphPad Prism 5.0 software. The results are expressed as mean \pm SEM and the results were considered significant when $p \leq 0.05$.

Results

The duration of freezing behavior measured during the SR are shown in Fig.3. The statistical analysis revealed that the inescapable footshock used as a PTSD inducing protocol showed a significant effect on the EBR group ($p \leq 0.001$) and on the MBR group ($p \leq 0.01$), as denoted by a longer duration of the freezing time when compared to the control group. Moreover, the animals from the EBR group remained more time in freezing when compared with animals from the MBR group ($p \leq 0.001$). Thus, we demonstrate that the PTSD inducing protocol is capable of generating fear behavior and does not affect all animals equally.

The glucose metabolism in the amygdala region analyzed by the mean 18F-FDG SUVR are shown in Fig.4. The animals were submitted to the microPET scanning at two different time points. On day 1, before the experimental procedures, to evaluate the basal metabolic activity and eight days after, to observe the effects of the PTSD protocol on the amygdala glucose metabolism during the SR. The one-way ANOVA for repeated measures showed no statistically significant differences in the 18F-FDG SUVRs between the groups.

The number, size and shape of the dendritic spines in the BLA from all the experimental groups were studied (Fig. 5). The statistical analysis revealed a significant increase in the spine density, showing that the animals in the EBR group had more proximal dendritic spines when compared with the animals from the control group ($p \leq 0.05$) (Fig.6a). According to their classification, stubby/wide, thin and mushroom-like spines were the most common types found in the BLA neurons, although there was no statistically significant difference in the number of each type of spine between the groups (Fig.6b). Also, morphometric data about the spine length, neck length, head diameter and neck diameter did not differ in any spine type among the groups (Fig.7 a-d).

Discussion

In our study we show that, as observed in humans, animals can express individual differences in their behavioral responses when exposed to a situational trauma. The inescapable footshock protocol used to induce PTSD symptoms revealed that the animals were not equally affected, as shown by the different durations of freezing behavior.

Our results demonstrate that animals classified in the EBR and MBR groups showed longer duration of freezing behavior when compared to the control group. Moreover, animals from the EBR group remained more time in freezing when compared with animals from the MBR group. These findings support previous reports which showed that stressed animals submitted to the same protocol can either remain unaffected or exhibit different levels of fear behavior (Cohen et al. 2003, 2004, 2014; Mitra et al. 2005; Saur et al. 2017), even in inbred lines (Krishnan et al. 2007). The reasons for this resilience or susceptibility remain unknown, although some studies suggest that the susceptibility to develop stress-related disease is associated with genetic factors, early life stress, past experience, microbiome and the

individual neurobiology (Heim and Nemeroff 2001; Mitra et al. 2005; Diehl et al. 2007; McEwen 2008; Adamec et al. 2012; Luczynski et al. 2016; Malan-Muller et al. 2018).

Our results show no alterations in the amygdala glucose metabolism between the experimental groups in either evaluations. Few studies have analyzed the encephalic metabolism in animal models of PTSD. A previous study by our research group shows a similar result 24 hours after the situational reminder, thus, these findings corroborate the idea that PTSD does not produce a significant change in amygdala metabolism immediately or 24 hours after the situational reminder (Saur et al. 2017). Additionally, our findings are in accordance with a recent study using microPET/18F-FDG imaging which also reported unchanged amygdala glucose metabolism when comparing the animals' baseline scans with the scans realized immediately after the fear conditioning procedure and one week later (Radford et al. 2018). On the other hand, a previous study, using a fear conditioning protocol which consisted of 10 sets of tones (30s, 75 dB) that co-terminated with a footshock (1s, 0.5mA) showed an increase in amygdala metabolism after this stress protocol (Zhu et al. 2016). It is possible that different stress intensities and frequencies, associated with an auditory stimulus might generate a more pronounced amygdala response and consequently an increase in amygdala glucose metabolism.

In clinical research, several conflicting results have been reported regarding the amygdala metabolism in patients with PTSD. Studies evaluating 18F-FDG or cerebral blood flow (CBF) in this area show increased (Vermetten et al. 2007; Yehuda et al. 2009; Ramage et al. 2015), decreased (Yehuda et al. 2009; Stocker et al. 2014; Buchsbaum et al. 2015) and unaltered (Molina et al. 2010) glucose metabolism and CBF. These inconsistent findings may be due to the physiological complexity of PTSD and other factors should be considered such as the length of time since the onset of PTSD, different trauma type and severity and the distinct paradigms performed during the analyses (resting state, symptom provocation, trauma-related sensory stimuli).

In our study, we analyzed number and morphology of dendritic spines from BLA neurons one day after a situational reminder. We show that animals from the EBR group, which exhibit more pronounced fear behavior, have an increased number of proximal dendritic spines. Our result is in accordance with a previous study where animals with extreme PTSD-like behavioral disruption demonstrated an increase in spine density and in dendritic arborization of BLA pyramidal neurons (Cohen et al. 2014). Furthermore, other

studies evaluated the association between BLA neurons and emotional resilience and reported that individuals with more anxiety-like behaviors also showed higher BLA dendritic complexity and spine density (Mitra et al. 2009; Adamec et al. 2012; Hegde et al. 2017).

In addition, these changes in spine density appear to be long-lasting, as shown in another study where animals submitted to a fear conditioning paradigm revealed an overall increase in the BLA spine density and neuronal hypertrophy, which persisted for more than a month following the initial fear learning, suggesting long-term effects on dendritic plasticity. Moreover, this study suggests that these morphological alterations can be reversed with extinction training (Heinrichs et al. 2013). Other paradigms, such as chronic stress (Vyas et al. 2002, 2006; Mitra et al. 2005), stress hormones (Mitra and Sapolsky 2008), early life stress (Koe et al. 2016) and social stress (Patel et al. 2018) also revealed dendritic arborization and higher spine density in BLA neurons associated with anxiety-like behaviors.

To the best of our knowledge, this is the first study to count the number of each spine type according to their morphology (as thin, mushroom, stubby/wide, ramified and atypical) and measure their morphometrical data regarding spine length (SL), neck length (NL), head diameter (HD) and neck diameter (ND) in the BLA of an animal model of PTSD. Considering the spine type, no statistical difference was found either in the number of each spine type between the groups or in any structural changes evaluated by the measured parameters of SL, NL, HD and ND. Thus, we suppose that the behavioral plasticity induced by our stress protocol is not associated with morphological changes in spines or metabolic changes in amygdala evaluated by 18F-FDG.

Conclusions

In conclusion, our study demonstrates that animals exposed to the same situational trauma can express individual differences in their behavior, showing more or less susceptibility to the stress situation. Animals that showed extreme behavioral response (EBR) also demonstrated an increase in proximal dendritic spine density from BLA neurons with no alterations in the shape or morphometric parameters of the spines and no metabolic changes in amygdala analyzed by 18F-FDG. We hope that our findings could help other researchers to understand the morphological bases of individual differences in the neurobiology underlying PTSD and other stress-related disorders.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Author Contributions

LTN, LLX, AARF and RGM designed the study, interpreted the data and elaborated the manuscript. LTN, PFRN, LVP, BBM, GZL and RBS conducted the experimental procedures. LTN, MZ, MMBPO, LVP and PFRN collected and interpreted the data. GTV, SG and JCC conducted the microPET-CT scans.

Acknowledgements

This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). JCD, AARF and LLX are CNPq investigators.

REFERENCES

- Adamec R, Hebert M, Blundell J, Mervis RF (2012) Dendritic morphology of amygdala and hippocampal neurons in more and less predator stress responsive rats and more and less spontaneously anxious handled controls. *Behav Brain Res*. doi: 10.1016/j.bbr.2011.09.009
- American PA (2013) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5*, 5th edn. APA, Washington
- Arellano JI, Espinosa A, Fairén A, et al (2007) Non-synaptic dendritic spines in neocortex. *Neuroscience* 145:464–469. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.12.015
- Baptista PPA, Saur L, Bagatini PB, et al (2015) Antidepressant Effects of Ketamine Are Not Related to 18F-FDG Metabolism or Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity in the Ventral Tegmental Area of Wistar Rats. *Neurochem Res* 40:1153–1164. doi: 10.1007/s11064-015-1576-3
- Benjet C, Bromet E, Karam EG, et al (2016) The epidemiology of traumatic event exposure worldwide: results. *Psychol Med* 46:327–343. doi: 10.1017/S0033291715001981
- Bourne J, Harris KM (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol* 17:381–386. doi: 10.1016/j.conb.2007.04.009
- Brusco J, Dall'Oglio A, Rocha LB, et al (2010) Descriptive findings on the morphology of dendritic spines in the rat medial amygdala. *Neurosci Lett* 483:152–156. doi: 10.1016/j.neulet.2010.07.083
- Brusco J, Merlo S, Ikeda ÉT, et al (2014) Inhibitory and multisynaptic spines, and hemispherical synaptic specialization in the posterodorsal medial amygdala of male and female rats. *J Comp Neurol* 522:2075–2088. doi: 10.1002/cne.23518
- Buchsbaum MS, Simmons AN, DeCastro A, et al (2015) Clusters of Low 18 F-Fluorodeoxyglucose Uptake Voxels in Combat Veterans with Traumatic Brain Injury and Post-Traumatic Stress Disorder. *J Neurotrauma* 32:1736–1750. doi: 10.1099/vir.0.81055-0
- Bush DEA, Sotres-Bayon F, LeDoux JE (2007) Individual differences in fear: Isolating fear reactivity and fear recovery phenotypes. *J Trauma Stress* 20:413–422. doi: 10.1002/jts.20261
- Chen Y, Sabatini BL (2012) Signaling in dendritic spines and spine microdomains. *Curr Opin Neurobiol* 22:389–396. doi: 10.1016/j.conb.2012.03.003
- Cohen H, Kozlovsky N, Matar MA, et al (2014) Distinctive hippocampal and amygdalar cytoarchitectural changes underlie specific patterns of behavioral disruption following stress exposure in an animal model of PTSD. *Eur Neuropsychopharmacol*. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.09.009
- Cohen H, Zohar J, Matar M (2003) The relevance of differential response to trauma in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 53:463–473. doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01909-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01909-1)
- Cohen H, Zohar J, Matar MA, et al (2004) Setting Apart the Affected: The Use of Behavioral

Criteria in Animal Models of Post Traumatic Stress Disorder.
Neuropsychopharmacology 29:1962

- Dall'Oglio A, Dutra ACL, Moreira JE, Rasia-Filho AA (2015) The human medial amygdala: Structure, diversity, and complexity of dendritic spines. *J Anat* 227:440–459. doi: 10.1111/joa.12358
- de Castilhos J, Forti CD, Achaval M, Rasia-Filho AA (2008) Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: A Golgi study. *Brain Res* 1240:73–81. doi: 10.1016/j.brainres.2008.09.002
- Diehl LA, Silveira PP, Leite MC, et al (2007) Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats. *Brain Res* 1144:107–116. doi: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.084>
- Fenster RJ, Lebois LAM, Ressler KJ, Suh J (2018) Brain circuit dysfunction in post-traumatic stress disorder: from mouse to man. *Nat Rev Neurosci* 9:535–551. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.047.Long
- Gipson CD, Olive MF (2017) Structural and functional plasticity of dendritic spines – root or result of behavior? *Genes, Brain Behav* 16:101–117. doi: 10.1111/gbb.12324
- Harris KM, Jensen FE, Tsao B (1992) Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci* 12:2685–705
- Heck N, Betuing S, Vanhoutte P, Caboche J (2012) A deconvolution method to improve automated 3D-analysis of dendritic spines: Application to a mouse model of Huntington's disease. *Brain Struct Funct* 217:421–434. doi: 10.1007/s00429-011-0340-y
- Hegde A, Soh Yee P, Mitra R (2017) Dendritic Architecture of Principal Basolateral Amygdala Neurons Changes Congruently with Endocrine Response to Stress. *Int J Environ Res Public Health* 14:779. doi: 10.3390/ijerph14070779
- Heim C, Nemeroff CB (2001) The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49:1023–1039
- Heinrichs SC, Leite-Morris KA, Guy MD, et al (2013) Dendritic structural plasticity in the basolateral amygdala after fear conditioning and its extinction in mice. *Behav Brain Res*. doi: 10.1016/j.bbr.2013.03.048
- Kessler RC, Sonnega A, Bromet E, et al (1995) Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 52:1048–1060
- Koe AS, Ashokan A, Mitra R (2016) Short environmental enrichment in adulthood reverses anxiety and basolateral amygdala hypertrophy induced by maternal separation. *Transl Psychiatry* 6:e729. doi: 10.1038/tp.2015.217
- Krishnan V, Han M-H, Graham DL, et al (2007) Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. *Cell* 131:391–404. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.018>

- Lancelot S, Zimmer L (2010) Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 31:411–417. doi: 10.1016/j.tips.2010.06.002
- Leuner B, Shors TJ (2013) Stress, anxiety, and dendritic spines: What are the connections? *Neuroscience*. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.04.021
- Luczynski P, Whelan SO, O’Sullivan C, et al (2016) Adult microbiota-deficient mice have distinct dendritic morphological changes: differential effects in the amygdala and hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 44:2654–2666
- Malan-Muller S, Valles-Colomer M, Raes J, et al (2018) The Gut Microbiome and Mental Health: Implications for Anxiety- and Trauma-Related Disorders. *Omi A J Integr Biol* 22:90–107. doi: 10.1089/omi.2017.0077
- McEwen BS (2008) Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol* 583:174–185. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.071
- Mitra R, Ferguson D, Sapolsky RM (2009) SK2 potassium channel overexpression in basolateral amygdala reduces anxiety, stress-induced corticosterone secretion and dendritic arborization. *Mol Psychiatry* 14:827,847-855. doi: 10.1038/mp.2009.9
- Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, et al (2005) Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci*. doi: 10.1073/pnas.0504011102
- Mitra R, Sapolsky RM (2008) Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5573–5578. doi: 10.1073/pnas.0705615105
- Molina ME, Isoardi R, Prado MN, Bentolila S (2010) Basal cerebral glucose distribution in long-term post-traumatic stress disorder. *World J Biol Psychiatry* 11:493–501. doi: 10.3109/15622970701472094
- Musazzi L, Tornese P, Sala N, Popoli M (2018) What acute stress protocols can tell us about PTSD and stress-related neuropsychiatric disorders. *Front Pharmacol* 9:1–13. doi: 10.3389/fphar.2018.00758
- Patel D, Anilkumar S, Chattarji S, Buwalda B (2018) Repeated social stress leads to contrasting patterns of structural plasticity in the amygdala and hippocampus. *Behav Brain Res* 347:314–324. doi: 10.1016/j.bbr.2018.03.034
- Paxinos, G., & Watson, C. (2008). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press
- Radford KD, Park TY, Jaiswal S, et al (2018) Enhanced fear memories and brain glucose metabolism (18 F-FDG-PET) following sub-anesthetic intravenous ketamine infusion in Sprague-Dawley rats. *Transl Psychiatry* 8:263. doi: 10.1038/s41398-018-0310-8
- Ramage AE, Litz BT, Resick PA, et al (2015) Regional cerebral glucose metabolism differentiates danger- and non-danger-based traumas in post-traumatic stress disorder. *Soc Cogn Affect Neurosci* 11:234–242. doi: 10.1093/scan/nsv102
- Rasia-Filho AA, Fabian C, Rigoti KM, Achaval M (2004) Influence of sex, estrous cycle and

- motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience* 126:839–847. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.04.009
- Rasia-Filho AR-F (2010) Dendritic spines observed by extracellular DiI dye and immunolabeling under confocal microscopy. *Protoc Exch* 1–16. doi: 10.1038/nprot.2010.153
- Rauch SL, Whalen PJ, Shin LM, et al (2000) Exaggerated amygdala response to masked facial stimuli in posttraumatic stress disorder: a functional MRI study. *Biol Psychiatry* 47:769–776
- Saur L, Neves LT, Greggio S, et al (2017) Ketamine promotes increased freezing behavior in rats with experimental PTSD without changing brain glucose metabolism or BDNF. *Neurosci Lett* 658:6–11. doi: 10.1016/j.neulet.2017.08.026
- Shalev A, Liberzon I, Marmar C (2017) Posttraumatic stress disorder. *New Engl J o f Med* 376:2459–2469. doi: 10.1016/B978-0-12-803457-6.00013-1
- Shin LM, Wright CI, Cannistraro PA, et al (2005) A functional magnetic resonance imaging study of amygdala and medial prefrontal cortex responses to overtly presented fearful faces in posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 62:273–281. doi: 10.1001/archpsyc.62.3.273
- Shu Y, Xu T (2017) Chronic Social Defeat Stress Modulates Dendritic Spines Structural Plasticity in Adult Mouse Frontal Association Cortex. *Neural Plast* 2017:. doi: 10.1155/2017/6207873
- Stewart MG, Popov VI, Kraev I V., et al (2014) Structure and complexity of the synapse and dendritic spine. In: *The Synapse*. New York: Academic Press, pp 1–20
- Stocker RPJ, Ciepely MA, Paul B, et al (2014) Combat-related blast exposure and traumatic brain injury influence brain glucose metabolism during REM sleep in military veterans. *Neuroimage* 99:207–214. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.05.067>
- Tovote P, Fadok JP, Lüthi A (2015) Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci* 16:317–331. doi: 10.1038/nrn3945
- Vermetten E, Schmahl C, Southwick SM, Bremner JD (2007) Positron tomographic emission study of olfactory induced emotional recall in veterans with and without combat-related posttraumatic stress disorder. *Psychopharmacol Bull* 40:8–30
- Virdee K, Cumming P, Caprioli D, et al (2012) Applications of positron emission tomography in animal models of neurological and neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1188–1216. doi: 10.1016/j.neubiorev.2012.01.009
- Vyas A, Jadhav S, Chattarji S (2006) Prolonged behavioral stress enhances synaptic connectivity in the basolateral amygdala. *Neuroscience*. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.08.003
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S (2002) Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 22:6810–6818. doi: 20026655
- Vyas A, Pillai AG, Chattarji S (2004) Recovery after chronic stress fails to reverse

amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience*. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.07.013

Yehuda R, Harvey PD, Golier JA, et al (2009) Changes in Relative Glucose Metabolic Rate Following Cortisol Administration in Aging Veterans with Posttraumatic Stress Disorder: An FDG-PET Neuroimaging Study. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. doi: 10.1176/jnp.2009.21.2.132

Yehuda R, Hoge CW, McFarlane AC, et al (2015) Post-traumatic stress disorder. *Nat Rev Dis Prim* 1:15057

Zancan M, da Cunha RSR, Schroeder F, et al (2018) Remodeling of the number and structure of dendritic spines in the medial amygdala: From prepubertal sexual dimorphism to puberty and effect of sexual experience in male rats. *Eur J Neurosci* 48:1851–1865. doi: 10.1111/ejn.14052

Zancan M, Dall'Oglio A, Quagliotto E, Rasia-Filho AA (2017) Castration alters the number and structure of dendritic spines in the male posterodorsal medial amygdala. *Eur J Neurosci* 45:572–580. doi: 10.1111/ejn.13460

Zhang JY, Liu TH, He Y, et al (2018) Chronic Stress Remodels Synapses in an Amygdala Circuit-Specific Manner. *Biol Psychiatry* 189–201. doi: 10.1016/j.biopsych.2018.06.019

Zhu Y, Du R, Zhu Y, et al (2016) PET Mapping of Neurofunctional Changes in a Posttraumatic Stress Disorder Model. *J Nucl Med* 57:1474–1477. doi: 10.2967/jnumed.116.173443

Legends

Fig. 1 Timeline depicting the experimental procedures

Fig. 2 a Schematic diagram of a brain section showing the BLA (at -2.40 mm posterior to the bregma) marked in grey. Adapted from Paxinos and Watson Rat Brain Atlas (2008). **b** Digitalized image showing a BLA bitufted neuron. **c** Digitalized image showing a BLA stellate neuron

Fig. 3 The duration of freezing behavior measured during the SR. Both EBR and MBR groups showed longer duration of freezing time when compared to the control group. Additionally, animals from the EBR group remained more time in freezing when compared with animals from the MBR group $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$

Fig. 4 a ^{18}F -FDG uptake in the amygdala region. The results are expressed as standard uptake value ratio (SUVr). **b** ^{18}F -FDG rat template in coronal (top-left), sagittal (top-mid), and transverse (top-right) views and a microCT rat template in coronal (bottom-left), sagittal (bottom-mid), and transverse (bottom-right) views. The amygdala, outlined in purple, was defined using a ratROI-template based on Paxinos coordinates

Fig. 5 Digitized fluorescent images of neurons labeled with DiI and reconstructed by confocal microscopy. Representative proximal dendritic branches showed pleomorphic spines in the basolateral amygdala of rats from control, MBR and EBR groups. Samples under higher magnification are shown on the right. s=stubby; t=thin; m=mushroom; w=wide

Fig. 6 Values (mean \pm SEM) for **a** the density of overall dendritic spines measured in the proximal $40\mu\text{m}$ and **b** the number of each dendritic spine type evaluated in the proximal $40\mu\text{m}$ in the basolateral amygdala neurons (BLA) $*p \leq 0.05$

Fig. 7 Morphometric data (mean \pm SEM) regarding the **a** spine length, **b** head diameter, **c** neck length and **d** neck diameter measured in μm for the different spine types in the basolateral amygdala from each experimental group. Right-hand images exemplify each morphological parameter measured

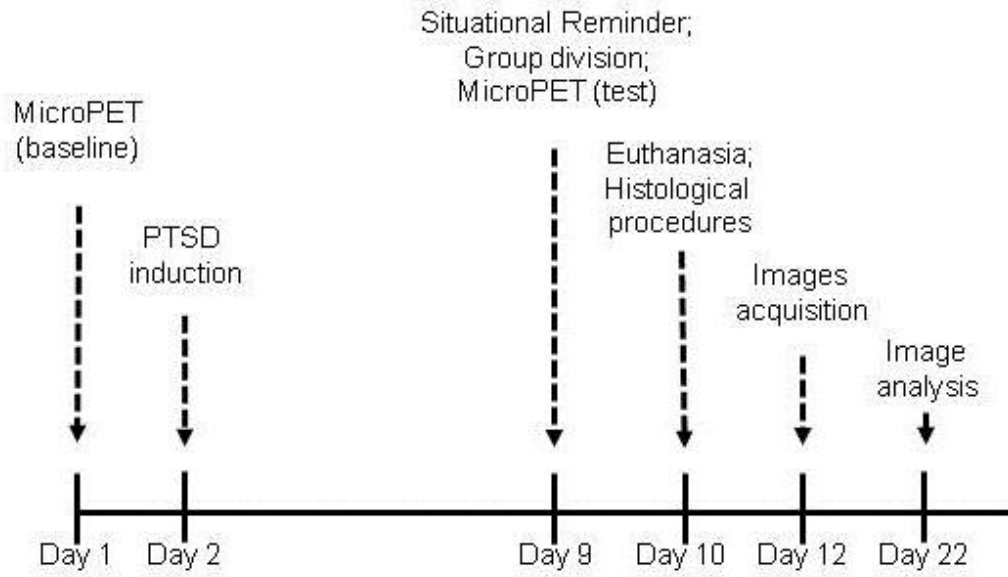
Fig. 1

Fig. 2

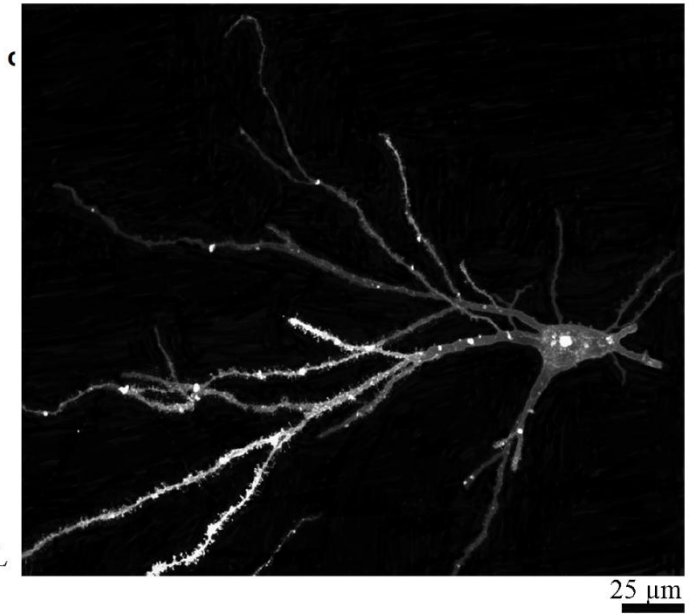
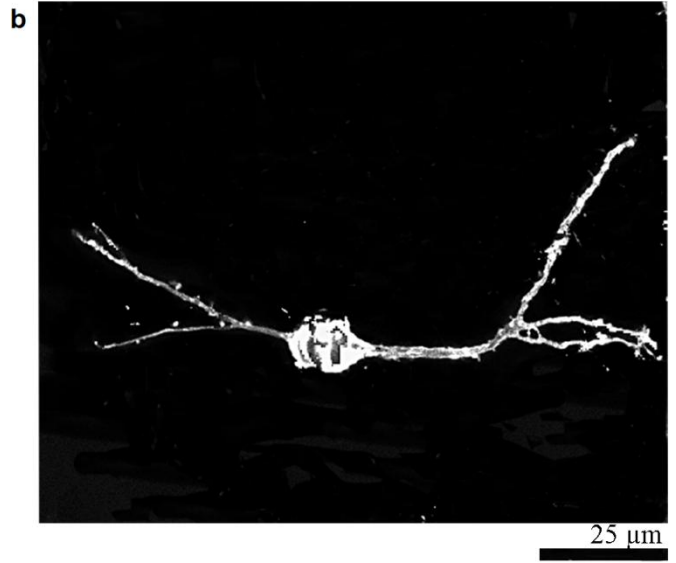
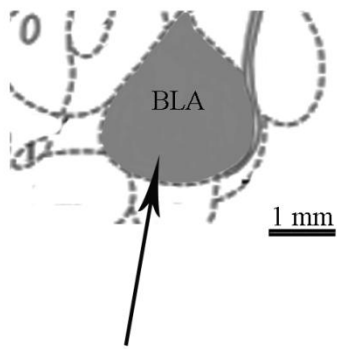


Fig. 3

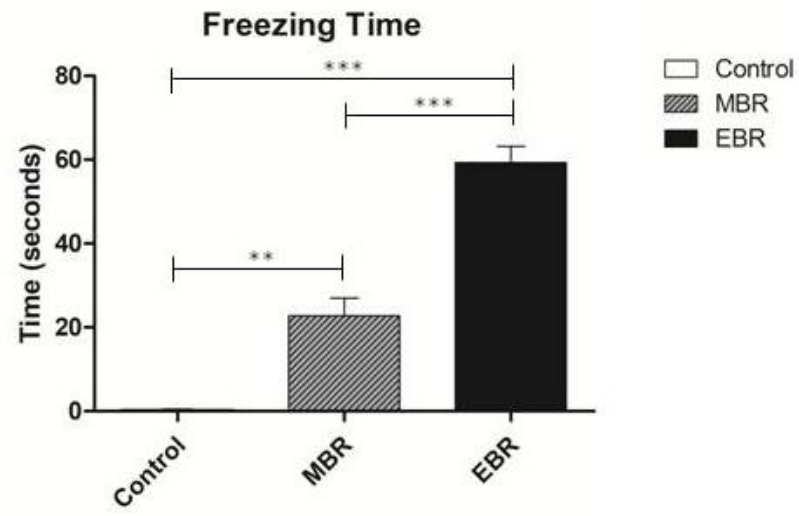


Fig. 4

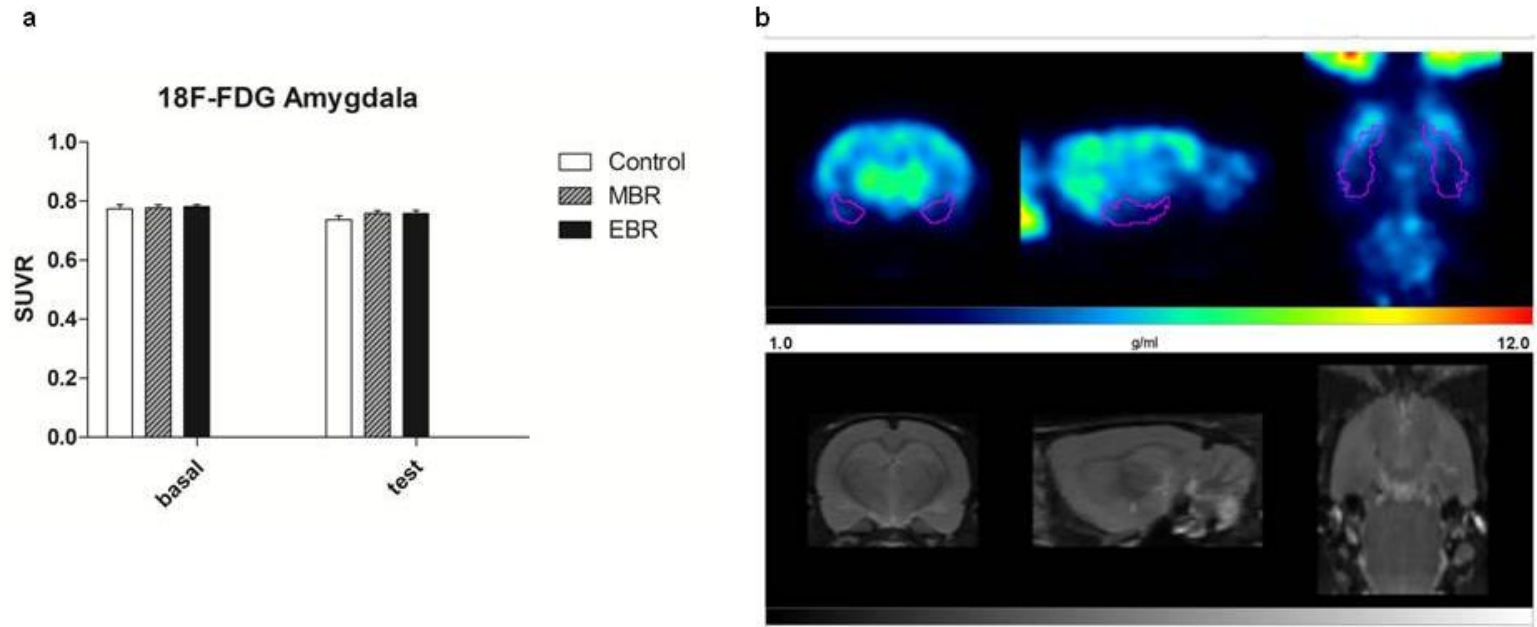
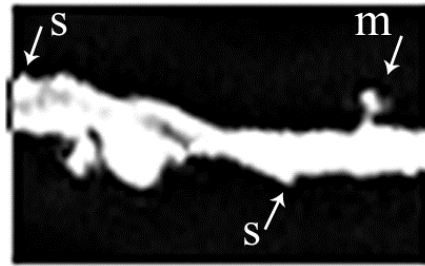
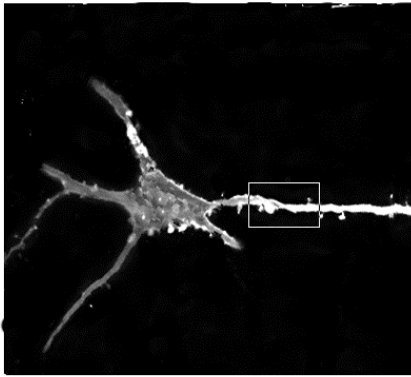
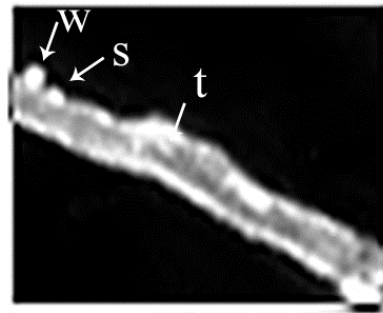
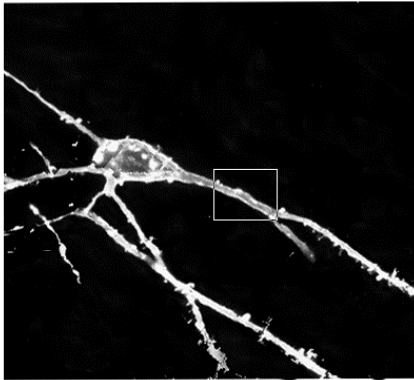


Fig. 5

Control



MBR



EBR

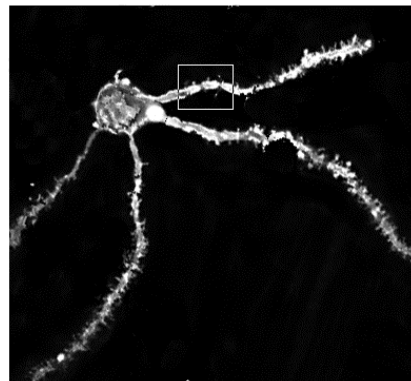
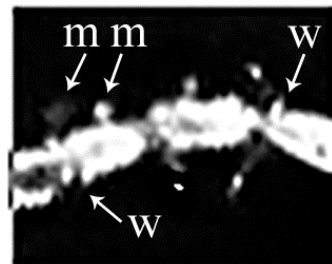
20 μm 5 μm

Fig. 6

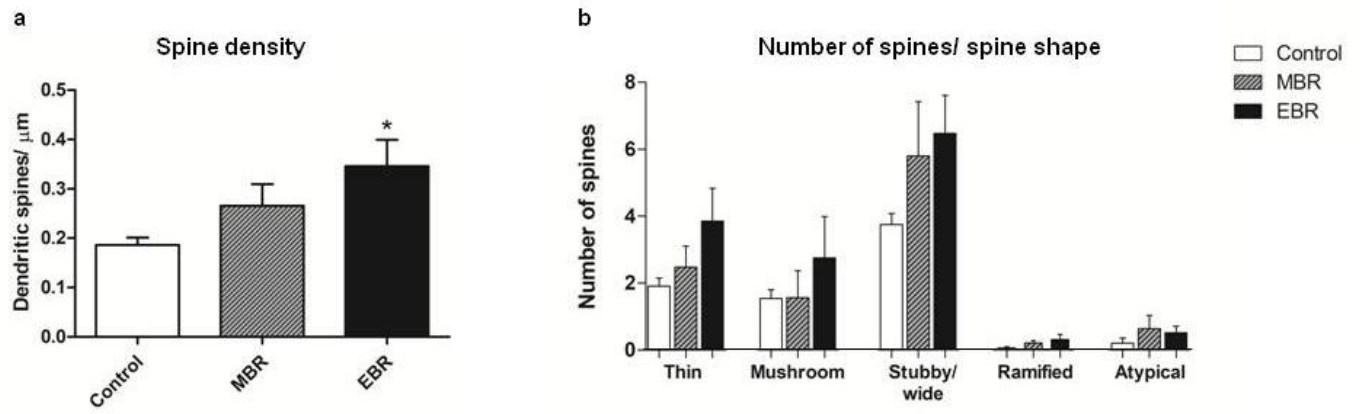
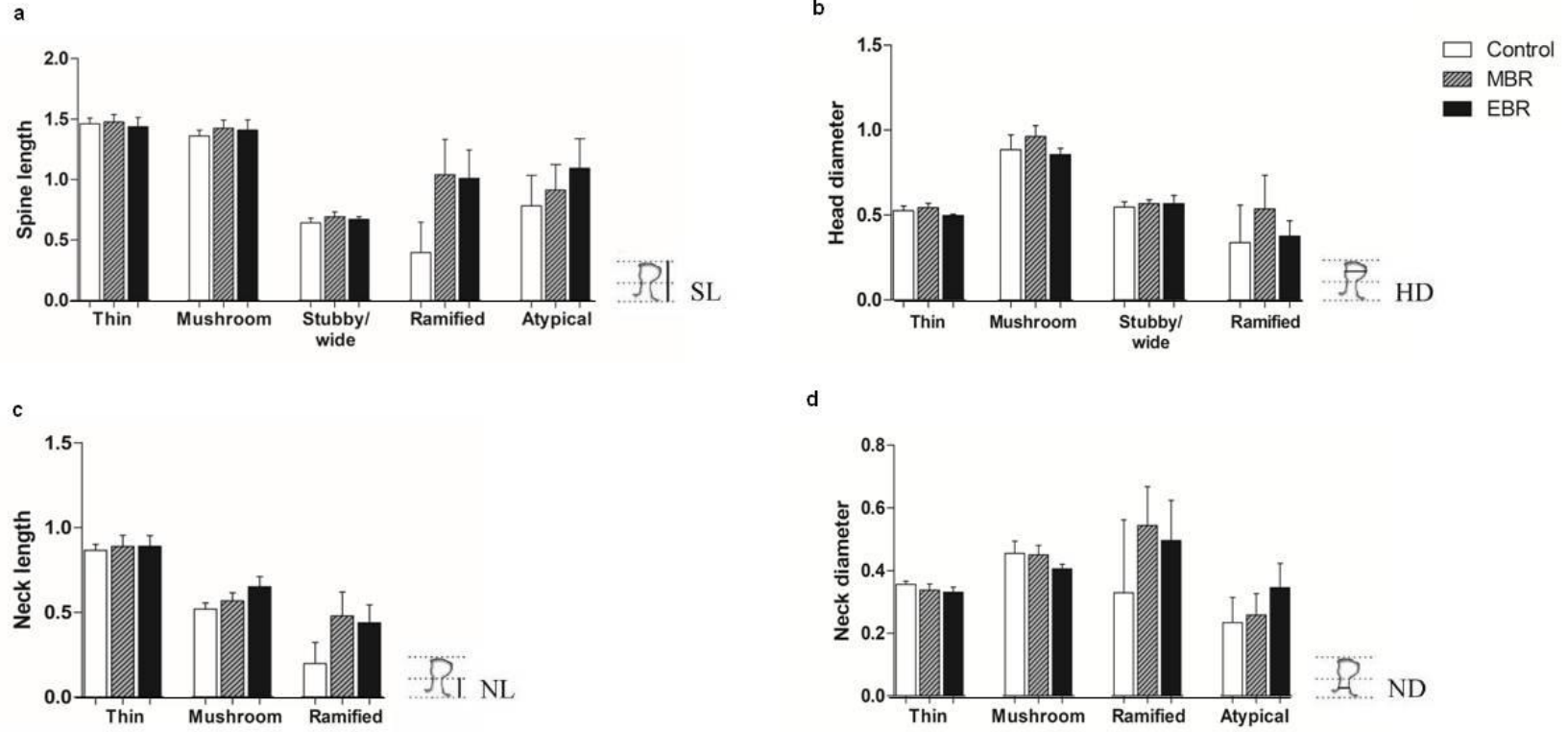


Fig. 7



Capítulo III

Considerações Finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo revelam que a resposta comportamental extrema induzida por um protocolo experimental de TEPT foi capaz de gerar um aumento imediato na densidade dos espinhos dendríticos em neurônios da amígdala basolateral de ratos *Wistar*, e que estas alterações não estão associadas com mudanças na morfologia e na morfometria dos espinhos, nem com alterações metabólicas destes animais.

Os nossos resultados demonstram que o choque nas patas utilizado como modelo experimental de TEPT é capaz de gerar diferentes respostas comportamentais nos roedores. Como observado em humanos, os animais podem apresentar diferenças individuais em relação a exposição a um evento traumático. Neste estudo, avaliamos a duração em que cada animal permaneceu em *freezing* quando reexpostos ao contexto aversivo. Os roedores que permaneceram mais tempo em *freezing* foram classificados como “*extreme behavior response*” (EBR) e os que apresentaram menor tempo em *freezing* foram classificados como “*minimal behavior response*” (MBR). Nossos achados corroboram com estudos anteriores que demonstraram que animais submetidos a um mesmo protocolo estressor podem apresentar diferentes níveis de comportamento de medo (Cohen et al. 2003, 2004, 2014; Mitra et al. 2005; Saur et al. 2017), mesmo em linhagem laboratoriais isogênicas (Krishnan et al., 2007). Acreditamos que este seja um modelo experimental interessante para mimetizar o desenvolvimento da doença, pois assim é possível abranger as populações resilientes e vulneráveis, que apresentam comportamentos heterogêneos.

Neste estudo, não foram encontradas diferenças imediatas no metabolismo da glicose na região da amígdala entre os diferentes grupos. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, nos quais não foram observadas nenhuma alteração no metabolismo da glicose quando avaliado 24 horas após a reexposição ao contexto aversivo (Saur et al, 2017). Um estudo recente também avaliou os animais nestes dois diferentes momentos e não foram observadas diferenças entre os scans (Radford et al, 2018). Dessa forma, acreditamos que o protocolo de TEPT não é capaz de produzir alterações significativas imediatas e tampouco em 24 horas no metabolismo da amígdala. Com base nisso, seria interessante avaliar os efeitos de longo prazo do TEPT sobre estes parâmetros em estudos futuros.

Outro importante achado deste estudo revelou que houve um aumento imediato na densidade de espinhos dendríticos na amígdala basolateral dos animais que apresentaram uma resposta comportamental extrema ao protocolo de TEPT. Assim, corroboramos com estudos anteriores que demonstraram uma relação positiva entre animais mais ansiosos e uma maior complexidade dendrítica e densidade de espinhos nos neurônios desta região (Mitra et al. 2009; Adamec et al. 2012; Cohen et al, 2014; Hegde et al. 2017).

Neste estudo, não foram encontradas alterações no número de cada tipo de espinho (finos, cogumelos, achatados/espessos, ramificados e atípicos) e nem em dados quantitativos sobre o comprimento dos espinhos, comprimento do pescoço, diâmetro da cabeça e diâmetro do pescoço entre os diferentes grupos. Estes resultados revelam dados novos e inéditos na literatura do TEPT. Como não foram encontradas alterações significativas nos parâmetros avaliados, acreditamos que a plasticidade comportamental induzida pelo protocolo de TEPT não está associada com mudanças morfológicas e morfométricas dos espinhos dendríticos.

Deste modo, esperamos que os resultados obtidos e apresentados nesta dissertação devam ter contribuído para um melhor entendimento sobre as alterações comportamentais, metabólicas e estruturais que acompanham o TEPT e possam auxiliar o desenvolvimento das neurociências nesta área.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed., text revision. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2000.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th ed.: DSM-5. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing, 2013.
- ADAMEC, R.; TOTH, M.; HALLER, J.; HALASZ, J.; BLUNDELL, J. A comparison of activation patterns of cells in selected prefrontal cortical and amygdala areas of rats which are more or less anxious in response to predator exposure or submersion stress. *Physiology & behavior*, v. 105, p. 628 – 38, 10 2012.
- ALVAREZ, V. A.; SABATINI, B. L. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annual review of neuroscience*, v. 30, p. 79 – 97, 2 2007.
- BALI, A.; JAGGI, A. S. Electric foot shock stress: a useful tool in neuropsychiatric studies. *Reviews in the neurosciences*, v. 26, p. 655 – 77, 7 2015.
- BARTOLOMUCCI, A. Social stress, immune functions and disease in rodents. *Frontiers in neuroendocrinology*, v. 28, p. 28 – 49, 3 2007.
- BAPTISTA, P. P. A. et al. Antidepressant Effects of Ketamine Are Not Related to ¹⁸F-FDG Metabolism or Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity in the Ventral Tegmental Area of Wistar Rats. *Neurochemical research*, v. 40, p. 1153 – 64, 4 2015.
- BENNUR, S.; RAO, B. S. S.; PAWLAK, R.; STRICKLAND, S.; MCEWEN, B. S.; CHATTARJI, S. Stress-induced spine loss in the medial amygdala is mediated by tissue-plasminogen activator. *Neuroscience*, v. 144, p. 8 – 16, 10 2007.
- BORGHANS, B.; HOMBERG, J. R. Animal models for posttraumatic stress disorder: An overview of what is used in research. *World J Psychiatry*, Baishideng Publishing Group Inc, v. 5, n. 4, p. 387 – 396, 2015.
- BOURNE, J.; HARRIS, K. M. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current opinion in neurobiology*, v. 17, p. 381 – 6, 5 2007.
- BREMNER, J. D. et al. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *The American journal of psychiatry*, v. 152, p. 973 – 81, 7 1995.
- BREMNER, J. D. et al. Magnetic resonance imaging-based measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder related to childhood physical and sexual abuse—a preliminary report. *Biological psychiatry*, v. 41, p. 23 – 32, 1 1997
- BRESLAU, N. et al. Trauma and posttraumatic stress disorder in the community: the 1996 Detroit Area Survey of Trauma. *Archives of general psychiatry*, v. 55, p. 626 – 32, 7 1998.
- BUCHSBAUM, M. S. et al. Clusters of Low (18)F-Fluorodeoxyglucose Uptake Voxels in Combat Veterans with Traumatic Brain Injury and Post-Traumatic Stress Disorder. *Journal of neurotrauma*, v. 32, p. 1736 – 50, 4 2015.

- BUSH, D. E. A.; SOTRES-BAYON, F.; LEDOUX, J. E. Individual differences in fear: isolating fear reactivity and fear recovery phenotypes. *Journal of traumatic stress*, v. 20, p. 413 – 22, 8 2007
- CARTER, R. N.; PINNOCK, S. B.; HERBERT, J. Does the amygdala modulate adaptation to repeated stress? *Neuroscience*, v. 126, p. 9 – 19, 5 2004.
- CARRASCO, G. A.; KAR, L. D. V. de. Neuroendocrine pharmacology of stress. *European journal of pharmacology*, v. 463, p. 235 – 72, 2 2003.
- CASTRO-GOMES, V. et al. A dendritic organization of lateral amygdala neurons in fear susceptible and resistant mice. *Neurobiology of learning and memory*, v. 127, p. 64 – 71, 12 2016.
- CHANG, J. et al. Comorbid diseases as risk factors for incident posttraumatic stress disorder (PTSD) in a large community cohort (KCIS no.PSY4). *Sci Rep*, Nature Publishing Group, v. 7, 2017.
- CHARNEY, D. S. Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress. *The American journal of psychiatry*, v. 161, p. 195 – 216, 2 2004.
- COHEN, H.; ZOHAR, J.; MATAR, M. The relevance of differential response to trauma in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biological psychiatry*, v. 53, p. 463 – 73, 3 2003.
- COHEN, H. et al. Setting apart the affected: the use of behavioral criteria in animal models of post traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 29(11): p. 1962–70, 2004.
- COHEN, H. et al. Distinctive hippocampal and amygdalar cytoarchitectural changes underlie specific patterns of behavioral disruption following stress exposure in an animal model of PTSD. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, v. 24, p. 1925 – 44, 12 2014.
- COYNER, J. et al. Mice selectively bred for High and Low fear behavior show differences in the number of pMAPK (p44/42 ERK) expressing neurons in lateral amygdala following Pavlovian fear conditioning. *Neurobiology of learning and memory*, v. 112, p. 195 – 203, 7 2014.
- DAVIS, M. Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. *The American psychologist*, v. 61, p. 741 – 756, 11 2006.
- DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 156, p. 2608 – 15, 4 1996.
- DHABHAR, F. S. Stress-induced augmentation of immune function—the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain, behavior, and immunity*, v. 16, p. 785 – 98, 12 2002.
- DIEHL, L. A. et al. Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats. *Brain research*, v. 1144, p. 107 – 16, 3 2007.

- EBNER, K.; RUPNIAK, N. M.; SARIA, A.; SINGEWALD, N. Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 4280 – 5, 3 2004.
- GARCIA, A.; ARMARIO, A. Individual differences in the recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis after termination of exposure to a severe stressor in outbred male Sprague-Dawley rats. *Psychoneuroendocrinology*, v. 26, p. 363 – 74, 3 2001.
- GIPSON, C. D.; OLIVE, M. F. Structural and functional plasticity of dendritic spines - root or result of behavior? *Genes, brain, and behavior*, v. 16, p. 101 – 117, 8 2017.
- GIUSTINO, T. F.; MAREN, S. The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. *Front Behav Neurosci, Frontiers Media S.A.*, v. 9, 2015.
- GODSIL, B. P.; KISS, J. P.; SPEDDING, M.; JAY, T. M. The hippocampal-prefrontal pathway: the weak link in psychiatric disorders? *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, v. 23, p. 1165 – 81, 1 2013.
- GRIFFITHS, J.; SHANKS, N.; ANISMAN, H. Strain-specific alterations in consumption of a palatable diet following repeated stressor exposure. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 42, n. 2, p. 219 – 227, 1992.
- HARDING, A. J.; STIMSON, E.; HENDERSON, J. M.; HALLIDAY, G. M. Clinical correlates of selective pathology in the amygdala of patients with Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology*, v. 125, p. 2431 – 45, 10 2002.
- HARRIS, K M.; SPACEK, J. Dendrite structure. In Stuart, G., Spruston, N. & Hausser, M. (eds), *Dendrites*. Oxford University Press, Oxford, p. 1–46, 2016.
- HEGDE A, Soh Yee P, Mitra R. Dendritic Architecture of Principal Basolateral Amygdala Neurons Changes Congruently with Endocrine Response to Stress. *Int J Environ Res Public Health* 14:779. doi: 10.3390/ijerph14070779, 2017.
- HEIM, C.; NEMEROFF, C. B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biological psychiatry*, v. 49, p. 1023 – 39, 6 2001.
- HERING, H.; SHENG, M. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 2, p. 880 – 8, 12 2001.
- HOGUE CW, Riviere LA, Wilk JE, Herrell RK, Weathers FW. The prevalence of post-traumatic stress disorder (PTSD) in US combat soldiers: a head-to-head comparison of DSM-5 versus DSM-IV-TR symptom criteria with the PTSD checklist. *Lancet Psychiatry* 2014; 1: 269-77
- HOGUE CW, Yehuda R, Castro CA, et al. Unintended consequences of changing the definition of posttraumatic stress disorder in DSM-5: critique and call for action. *JAMA Psychiatry* 2016; 73: 750-2.
- JOB, R. F.; BARNES, B. W. Stress and consumption: inescapable shock, neophobia, and quinine finickiness in rats. *Behavioral neuroscience*, v. 109, p. 106 – 16, 2 1995.

- KALISCH, R. et al. A conceptual framework for the neurobiological study of resilience. *The behavioral and brain sciences*, v. 38, p. e92- 8, 2015.
- KARAM EG, Friedman MJ, Hill ED, et al. Cumulative traumas and risk thresh- olds: 12-month PTSD in the World Mental Health (WMH) surveys. *Depress Anxiety* 2014; 31: 130-42.
- KASSEM, M. S.; LAGOPOULOS, J.; STAIT-GARDNER, T.; PRICE, W. S.; CHOHAN, T. W.; ARNOLD, J. C.; HATTON, S. N.; BENNETT, M. R. Stress-induced grey matter loss determined by MRI is primarily due to loss of dendrites and their synapses. *Molecular neurobiology*, v. 47, p. 645 – 61, 11 2013.
- KESSLER, R. C.; SONNEGA, A.; BROMET, E.; HUGHES, M.; NELSON, C. B. Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. *Archives of general psychiatry*, v. 52, p. 1048 – 60, 12 1995.
- KIM, E. J.; PELLMAN, B.; KIM, J. J. Stress effects on the hippocampus: a critical review. *Learn Mem*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 22, n. 9, p. 411 – 416, 2015.
- KRISHNAN, V. et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, v. 131, p. 391 – 404, 10 2007.
- KROLOW, R.; NOSCHANG, C.; ARCEGO, D. M.; PETTENUZZO, L. F.; WEIS, S. N.; MARCOLIN, M. L.; HUFFELL, A. P.; MOTA, C. S.; DALMAZ, C. Isolation stress exposure and consumption of palatable diet during the prepubertal period leads to cellular changes in the hippocampus. *Neurochemical research*, v. 38, p. 262 – 72, 11 2013.
- KUO, J. R.; KALOUPEK, D. G.; WOODWARD, S. H. Amygdala volume in combat-exposed veterans with and without posttraumatic stress disorder: a cross-sectional study. *Arch Gen Psychiatry*, V. 69, p. 1080–1086, 2012.
- LANCELOT, S.; ZIMMER, L. Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. *Trends in pharmacological sciences*, v. 31, p. 411 – 7, 7 2010.
- LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. *Annual review of neuroscience*, v. 23, p. 155 – 84, 6 2000.
- LIBERZON, I.; KRSTOV, M.; YOUNG, E. A. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology*, v. 22, p. 443 – 53, 8 1997.
- LIBERZON, I.; TAYLOR, S. F.; AMDUR, R.; JUNG, T. D.; CHAMBERLAIN, K. R.; MINOSHIMA, S.; KOEPPE, R. A.; FIG, L. M. Brain activation in PTSD in response to trauma-related stimuli. *Biological psychiatry*, v. 45, p. 817 – 26, 4 1999.
- LIBERZON, I.; KHAN, S.; YOUNG, E. A. Animal models of posttraumatic stress disorder. *Handbook of Stress and the Brain*, v.15, p.231-250, 2005.
- LINDAUER, R. J. et al. Smaller hippocampal volume in Dutch police officers with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, v. 56, p. 356–363, 2004.
- LINDAUER, R. J.; VLIETGER, E.; JALINK, M.; OLFF, M.; CARLIER, I. V. E.; MAJOIE, C. B. L. M.; HEETEN, G. J. D.; GERSONS, B. P. R. Effects of psychotherapy on hippocampal volume in out-patients with post-traumatic stress disorder: a MRI investigation. *Psychological medicine*, v. 35, p. 1421 – 31, 9 2005.

LUCASSEN, P. J.; PRUESSNER, J.; SOUSA, N.; ALMEIDA, O. F. X.; DAM, A. M. V.; RAJKOWSKA, G.; SWAAB, D. F.; CZÉH, B. Neuropathology of stress. *Acta neuropathologica*, v. 127, p. 109 – 35, 12 2014.

LUPIEN, S. J. et al. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 10, p. 434 – 45, 4 2009.

MAIER, S. F. Role of fear in mediating shuttle escape learning deficit produced by inescapable shock. *J Exp Psychol Anim Behav Process*, v. 16(2), p. 137-149, 1990.

MARCUZZO, S. *Estudo sobre a densidade de espinhos dendríticos de neurônios da amígdala medial póstero-dorsal de ratos em diferentes condições experimentais*. Dissertação. (Mestrado em Ciências Biológicas: Neurociências), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MARCUZZO, S.; DALL’OGLIO, A.; RIBEIRO, M. F. M.; ACHAVAL, M.; RASIA-FILHO, A. A. Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats. *Neuroscience letters*, v. 424, p. 16 – 21, 8 2007.

MAROUN, M.; IOANNIDES, P. J.; BERGMAN, K. L.; KAVUSHANSKY, A.; HOLMES, A.; WELLMAN, C. L. Fear extinction deficits following acute stress associate with increased spine density and dendritic retraction in basolateral amygdala neurons. *The European journal of neuroscience*, v. 38, p. 2611 – 20, 5 2013.

MCEWEN, B. S.; SEEMAN, T. Protective and damaging effects of mediators of stress. Elaborating and testing the concepts of allostasis and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 896, p. 30 – 47, 2 1999.

MCEWEN, B. S. Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1032, p. 1 – 7, 1 2004.

MCEWEN, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci*, Les Laboratoires Servier, France, v. 8, n. 4, p. 367 – 381, 2006.

MCEWEN, B. S. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European journal of pharmacology*, v. 583, p. 174 – 85, 2 2008.

MCEWEN, B. S.; GIANAROS, P. J. Stress- and allostasis-induced brain plasticity. *Annual review of medicine*, v. 62, p. 431 – 45, 8 2011.

MCGUIRE, J. L.; BERGSTROM, H. C.; PARKER, C. C.; LE, T.; MORGAN, M.; TANG, H.; SELWYN, R. G.; SILVA, A. C.; CHOI, K.; URSANO, R. J.; PALMER, A. A.; JOHNSON, L. R. Traits of fear resistance and susceptibility in an advanced intercross line. *The European journal of neuroscience*, v. 38, p. 3314 – 24, 8 2013.

MITRA et. Al. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA*, 28;102(26), p. 9371-6, 2005.

MITRA R, Ferguson D, Sapolsky RM. SK2 potassium channel overexpression in basolateral amygdala reduces anxiety, stress-induced corticosterone secretion and dendritic arborization. *Mol Psychiatry* 14:827,847-855. doi: 10.1038/mp.2009.9

- MOLINA, M. E.; ISOARDI, R.; PRADO, M. N.; BENTOLILA, S. Basal cerebral glucose distribution in long-term post-traumatic stress disorder. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, v. 11, p. 493 – 501, 3 2010.
- MOREY, R. A.; GOLD, A. L.; LABAR, K. S.; BEALL, S. K.; BROWN, V. M.; HASWELL, C. C.; NASSER, J. D.; WAGNER, H. R.; MCCARTHY, G.; WORKGROUP, M. M. Amygdala volume changes in posttraumatic stress disorder in a large case-controlled veterans group. *Archives of general psychiatry*, v. 69, p. 1169 – 78, 11 2012.
- MUSAZZI, L. et al.. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PloS one*, v. 5, p. e8566 – None, 1 2010.
- OH, W. C.; HILL, T. C.; ZITO, K. Synapse-specific and size-dependent mechanisms of spine structural plasticity accompanying synaptic weakening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, p. E305 – 12, 12 2013.
- PIETRZAK, R. H, Goldstein RB, Southwick SM, Grant BF. Prevalence and Axis I comorbidity of full and partial posttraumatic stress disorder in the United States: results from Wave 2 of the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *J Anxiety Disord* 2011; 25: 456-65.
- PIETRZAK, R. H. et al. Amygdala-hippocampal volume and the phenotypic heterogeneity of posttraumatic stress disorder: a cross-sectional study. *JAMA Psychiatry*, v. 72(4), p.396-8, 2015.
- RADFORD KD, Park TY, Jaiswal S, et al. Enhanced fear memories and brain glucose metabolism (18 F-FDG-PET) following sub-anesthetic intravenous ketamine infusion in Sprague-Dawley rats. *Transl Psychiatry* 8:263, 2018.
- RADLEY, J. J. et al. Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *The Journal of comparative neurology*, v. 507, p. 1141 – 50, 12 2008.
- RAMAGE, A. E. et al. Regional cerebral glucose metabolism differentiates danger- and non-danger-based traumas in post-traumatic stress disorder. *Social cognitive and affective neuroscience*, v. 11, p. 234 – 42, 9 2016.
- RAMÓN Y CAJAL, S. Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev Trim Histol Norm Pat* 1,1–10, 1888.
- RAMÓN Y CAJAL, S. *La Textura del Sistema Nerviosa del Hombre y los Vertebrados*. Moya, Madrid, 1899
- RAYMOND, C. et al. Early child adversity and psychopathology in adulthood: HPA axis and cognitive dysregulations as potential mechanisms. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 7 2017.
- REBER, S. O. Stress and animal models of inflammatory bowel disease—an update on the role of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*, v. 37, p. 1 – 19, 7, 2012.
- ROO, M. D. et al. Spine dynamics and synapse remodeling during LTP and memory processes. *Progress in brain research*, v. 169, p. 199 – 207, 4 2008.

ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem*, v.65, p.1–8, 1996.

RK, Weathers FW. The prevalence of post- traumatic stress disorder (PTSD) in US combat soldiers: a head-to-head comparison of DSM-5 versus DSM-IV-TR symptom criteria with the PTSD checklist. *Lancet Psychiatry* 2014; 1: 269-77

SEGAL, M. Dendritic spines and long-term plasticity. *Nat RevNeurosci* v.6, p. 277–284, 2005.

SALA, C.; SEGAL, M. Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiol Rev* v. 94, p. 141–188, 2014.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agent. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, v.10, p. 230a-231, 1998.

SANTIAGO, P. N. et al. A Systematic Review of PTSD Prevalence and Trajectories in DSM-5 Defined Trauma Exposed Populations: Intentional and Non-Intentional Traumatic Events. *PLoS One*, Public Library of Science, San Francisco, USA, v. 8, n. 4, 2013.

SAPOLSKY, R. M.; KREY, L. C.; MCEWEN, B. S. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrine reviews*, v. 7, p. 284 – 301, 8 1986.

SAUR, L.; NEVES, LAURA TARTARI ; GREGGIO, SAMUEL ; VENTURIN, GIANINA TERIBELE ; JECKEL, CRISTINA MARIA MORIGUCHI ; COSTA DA COSTA, JADERSON ; BERTOLDI, KARINE ; SCHALLENBERGER, BRUNA ; SIQUEIRA, IONARA RODRIGUES ; MESTRINER, RÉGIS GEMERASCA ; XAVIER, LÉDER LEAL . Ketamine promotes increased freezing behavior in rats with experimental PTSD without changing brain glucose metabolism or BDNF. *Neuroscience letters*, v. 658, p. 6 – 11, 8 2017.

SCHMAHL, C. et al. Hippocampus and amygdala volumes in patients with borderline personality disorder with or without posttraumatic stress disorder. *J Psychiatry Neurosci*, Canadian Medical Association, v. 34, n. 4, p. 289 – 295, 2009.

SHEKHAR, A. et al. Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, v. 8, p. 209 – 19, 1 2005.

SHIN, L. M. et al. Regional cerebral blood flow in the amygdala and medial prefrontal cortex during traumatic imagery in male and female Vietnam veterans with PTSD. *Archives of general psychiatry*, v. 61, p. 168 – 76, 2 2004b.

SHORT, K. R.; MAIER, S. F. Stressor controllability, social interaction, and benzodiazepine systems. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 45, p. 827 – 35, 8 1993.

SOUTHWICK, S.M.; CHARNEY, D.S. The science of resilience: implications for the prevention and treatment of depression. *Science (New York)*, v.388, p. 79-82, 10, 2012.

SOUSA, N.; ALMEIDA, O. F. X. Disconnection and reconnection: the morphological basis of (mal)adaptation to stress. *Trends in neurosciences*, v. 35, p. 742 – 51, 9 2012. STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, v. 85, p. 367 – 70, 1 2012.

- STOCKER, R. P. J.; CIEPLY, M. A.; PAUL, B.; KHAN, H.; HENRY, L.; KONTOS, A. P.; GERMAIN, A. Combat-related blast exposure and traumatic brain injury influence brain glucose metabolism during REM sleep in military veterans. *NeuroImage*, v. 99, p. 207 – 14, 6 2014.
- TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of psychosomatic research*, v. 53, p. 865 – 71, 10 2002.
- VAN DER ZEE, E.A. Synapses, spines and kinases in mammalian learning and memory, and the impact of aging. *Neurosci Biobehav Rev* 50, 77–85, 2015
- VEER, I. M.; OEI, N. Y. L.; BUCHEM, M. A. van; SPINHOVEN, P.; ELZINGA, B. M.; ROMBOUTS, S. A. R. B. Evidence for smaller right amygdala volumes in posttraumatic stress disorder following childhood trauma. *Psychiatry research*, v. 233, p. 436 – 42, 7 2015.
- VIRDEE, K.; CUMMING, P.; CAPRIOLI, D.; JUPP, B.; ROMINGER, A.; AIGBIRHIO, F. I.; FRYER, T. D.; RISS, P. J.; DALLEY, J. W. Applications of positron emission tomography in animal models of neurological and neuropsychiatric disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 36, p. 1188 – 216, 2 2012.
- VYAS, A.; MITRA, R.; RAO, B. S. S.; CHATTARJI, S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 22, p. 6810 – 8, 8 2002.
- WANG, X.; YANG, Y.; ZHOU, Q. Independent Expression of Synaptic and Morphological Plasticity Associated with Long-Term Depression. *The Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 45, Nov 2007.
- WENIGER, G.; LANGE, C.; SACHSSE, U.; IRLE, E. Amygdala and hippocampal volumes and cognition in adult survivors of childhood abuse with dissociative disorders. *Acta psychiatrica Scandinavica*, v. 118, p. 281 – 90, 9 2008.
- WOOLLEY, C. S.; MCEWEN, B. S. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *The Journal of comparative neurology*, v. 336, p. 293 – 306, 10 1993.
- YEHUDA, R. (2002) Post-traumatic stress disorder. *N Engl J Med* 10;346(2):108-14
- YEHUDA, R.; LEDOUX, J. Response variation following trauma: a translational neuroscience approach to understanding PTSD. *Neuron*, v. 56, p. 19 – 32, 10 2007.
- YEHUDA, R.; et al. Changes in relative glucose metabolic rate following cortisol administration in aging veterans with posttraumatic stress disorder: an FDG-PET neuroimaging study. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, v.21(2), p.132-43, 2009.
- YUSTE, R. *Dendritic Spines*. MIT Press, Cambridge, MA, 2010.
- ZHOU, Q.; HOMMA, K. J.; POO, M. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, v. 44, p. 749 – 57, 12 2004.
- ZHU, Y.; DU, R.; ZHU, Y.; SHEN, Y.; ZHANG, K.; CHEN, Y.; SONG, F.; WU, S.; ZHANG, H.; TIAN, M. PET Mapping of Neurofunctional Changes in a Posttraumatic Stress Disorder Model. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, v. 57, p. 1474 – 7, 3 2016.

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



SIPESQ Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 8481

Porto Alegre, 12 de janeiro de 2018

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Estudo das bases morfofisiológicas da resiliência e susceptibilidade ao estresse em ratos Wistar" coordenado por LEDER LEAL XAVIER.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 12/01/2018 - 12/03/2019

Nº de Animais	Espécie
120	Rattus norvegicus
Total de Animais: 120	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br