

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

ATIVACÃO NEURONAL DE CIRCUITOS FUNCIONAIS DO CEREBELO EM
FUNÇÕES MOTORAS E NÃO MOTORAS DE CAMUNDONGOS

José Mário Prati

São Carlos

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

ATIVAÇÃO NEURONAL DE CIRCUITOS FUNCIONAIS DO CEREBELO EM
FUNÇÕES MOTORAS E NÃO MOTORAS DE CAMUNDONGOS

José Mário Prati

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Fisioterapia na área de concentração Neurociências.

Orientadora: Professora Dra. Anna Carolyna Lepesteur Gianlorenço

Coorientador: Professor Dr. Thiago Luiz de Russo

Apoio Financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

São Carlos

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato José Mário Prati, realizada em 30/04/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Anna Carolyna Lepesteur Gianlorenço (UFSCar)

Profa. Dra. Ana Carolina de Campos (UFSCar)

Profa. Dra. Flavia Roberta Faganello Navega (UNESP)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia.

Estudo desenvolvido no Laboratório de Neurociências e Laboratório de Imunohistoquímica e Biologia Molecular do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos.

Projeto desenvolvido com apoio CAPES (Código de Financiamento 001).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria José,
por me apoiar incondicionalmente em todos os momentos em que
busquei alçar voos mais altos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Deus, por me proteger e me dar forças para superar os obstáculos da vida, mantendo meu caráter íntegro e me proporcionando capacitações a ajudar os que mais necessitam.

À minha mãe, Maria José, por me apoiar em diversas alçadas durante toda minha vida. À minha irmã, por me acompanhar em todos os processos, e à toda minha família pelo apoio.

À minha namorada, Nicole, pela compreensão e paciência nos momentos em que eu estava desenvolvendo este trabalho. E por todo apoio que me proporcionou durante este ciclo.

À amiga e colega de laboratório, Ms. Evelyn Maria Guilherme, por toda ajuda durante este ciclo nas mais diversas alçadas. E ao Dr. Jonathan Cunha por me receber em São Carlos e me apresentar aos ambientes aos quais eu atuaria como discente pesquisador.

Ao Centro de Reabilitação Pediátrica Primeiros Passos, por abrir suas portas, confiar no meu trabalho e possibilitar que eu atuasse em meu ofício logo na minha chegada à São Carlos.

A todo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos por me proporcionar conhecimentos pilares e me capacitar a ser um profissional melhor.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Anna Carolyn Lepesteur Gianlorenço por toda paciência e orientação à minha formação. Ao meu coorientador, Prof^o Dr. Thiago Luiz de Russo por todo auxílio e conhecimento transmitido para a conclusão dessa dissertação.

À banca examinadora, Prof^a Dra. Ana Carolina de Campos e à Prof^a Dra. Flávia Roberta Faganello Navega, pelo aceite em participar da defesa de dissertação e pelas contribuições enriquecedoras ao aperfeiçoamento deste trabalho.

A todos os animais que perderam sua vida para que fosse possível a coleta de dados deste trabalho.

A todos os colegas discentes que contribuíram de diversas formas para o aprimoramento profissional e pessoal durante este ciclo.

E por fim, à CAPES pelo financiamento para realização deste trabalho.

RESUMO

O cerebelo é uma estrutura encefálica envolvida no controle do equilíbrio, do movimento e na aquisição de habilidades motoras. Com os avanços científicos e tecnológicos, estudos demonstraram que o cerebelo também participa de funções não motoras, como controle emocional, memória e linguagem. Entretanto, ainda não se conhece quais áreas cerebelares e quais circuitos funcionais são predominantemente ativados nas diferentes funções. O objetivo deste estudo foi analisar a ativação neuronal de áreas cerebelares e de outras estruturas encefálicas (hipocampo, amígdala, córtex pré-límbico e córtex infra-límbico) após exposição aos modelos comportamentais de RotaRod e de modelo de Esquiva Inibitória, e estabelecer possíveis circuitos neuronais para as funções motoras e não motoras. Para isso, foram utilizados camundongos Suíço Albinos ingênuos, machos, pesando entre 25 e 35g. Para a avaliação comportamental, os animais foram submetidos à três condições: Esquiva Inibitória, modelo utilizado para inferir memória emocional; RotaRod que avalia desempenho motor e aprendizagem motora; e Caixa Moradia/Controle. Na condição 1, os camundongos permaneceram em sua caixa moradia; na condição 2, os camundongos foram expostos à caixa de Esquiva Inibitória por 2 dias; e na condição 3, os camundongos foram expostos ao RotaRod por 3 dias. Após a última exposição aos aparatos, os animais foram eutanasiados, e em seguida, perfundidos com Paraformoldeído e seus encéfalos extraídos e seccionados para análise de imunofluorescência da proteína c-Fos de estruturas pré-estabelecidas. Foram captadas imagens das estruturas encefálicas e analisada sua ativação neuronal microscopicamente. Foi utilizada a análise de variância ANOVA one way, seguida de teste post-hoc de Tukey. Não houve diferença significativa na expressão de c-Fos em lóbulo VI do cerebelo entre as diferentes condições. Em contrapartida, houve diferença na expressão de c-Fos em amígdala basolateral, córtex infra-límbico e córtex pré-límbico, que se tratam de estruturas encefálicas pertinentes à processos emocionais, na exposição dos animais aos aparatos de avaliação. O teste de Coeficiente de Correlação de Pearson r demonstrou haver correlação positiva entre as variáveis das estruturas relacionadas à processos emocionais. Concluímos que não houve diferença significativa na expressão de c-Fos em lóbulo VI do cerebelo na exposição dos animais aos aparatos de avaliação. Em contrapartida, houve diferença na expressão de c-Fos nas outras estruturas encefálicas pertinentes à processos emocionais na exposição dos animais aos aparatos de avaliação.

Palavras-chave: ativação neuronal, cerebelo, funções motoras, funções não motoras, c-Fos

ABSTRACT

The cerebellum is a brain structure involved in the control of balance, movement and the acquisition of motor skills. With scientific and technological advances, studies have shown that the cerebellum also participates in non-motor functions, such as emotional control, memory and language. However, it is not yet known which cerebellar areas and which circuits are predominantly activated in different functions. The aim of this study was to analyze the neuronal activation of cerebellar areas and other brain structures (hippocampus, amygdala and medial prefrontal cortex) after exposure to the behavioral models of RotaRod and the Inhibitory Avoidance model, and to develop possible neuronal circuits for the possible functions motor and non-motor. For that, naive, male Swiss Albino mice, weighing between 25 and 35 g, were used. For the behavioral evaluation, the animals were obtained under three conditions: home cage/control; Inhibitory Avoidance, emotional memory model; and RotaRod that assesses motor performance and motor learning. In condition 1, animals remained in the home-cage; in condition 2 they were exposed to the Inhibitory Avoidance protocol for 2 days; and in condition 3 to RotaRod for 3 days. After the last exposure to the apparatus, the animals were euthanized, and then perfused with Paraformaldehyde and its brain extracted and sectioned for immunofluorescence analysis of c-Fos protein from the structures. Images of the brain structure were captured and their neuronal activation were analyzed microscopically. One-Way ANOVA analysis of variance was used, followed by Tukey's post-hoc test. There was no significance in the expression of c-Fos in lobe VI of the cerebellum between the different conditions. In contrast, there was a difference in the expression of c-Fos in the basolateral amygdala, infralimbic cortex and prelimbic cortex, which are brain structures relevant to emotional processes, in the exposure of animals to the assessment apparatus. The Pearson Correlation Coefficient test demonstrated a positive correlation between the variables of the structures related to emotional processes. We concluded that there was no significant difference in the expression of c-Fos in lobe VI of the cerebellum in the exposure of animals to the evaluation apparatus. In contrast, was difference in the expression of c-Fos in the other brain structures relevant to emotional processes in the exposure of animals to the assessment apparatus.

Keywords: neuronal activation, cerebellum, motor functions, non-motor functions, c-Fos

LISTA DE ABREVIATURAS

Amígd: Amígdala

Cb: Cerebelo

CIL: Córtex infra-límbico

CPL: Córtex pré-límbico

cm: Centímetros

GD: Giro denteado

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

H-CA1: Hipocampo, CA1

H-CA3: Hipocampo, CA3

IEG's: Genes de expressão imediata

kg: Kilogramas

Lx: Unidade de medida de iluminação

mg: Miligramas

min: Minutos

mm: Milímetros

µm: Micrômetros

PBS: tampão fosfato salina

rpm: Rotações por minuto

s: Segundos

TNB: Tris-NaCl-blocking buffer

TSA: Tyramide Signal Amplification

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Circuito cerebelo-tálamo-cérebro-cortical.....	24
Figura 2. Figura representativa da comunicação do cerebelo com outras estruturas encefálicas.....	26
Figura 3. Caixa de Esquiva Inibitória.....	33
Figura 4. Figura representativa demonstrando uma linha do tempo referente aos procedimentos realizados na Condição 2 – Esquiva Inibitória.....	34
Figura 5. RotaRod automatizado.....	35
Figura 6. Figura representativa demonstrando uma linha do tempo referente aos procedimentos realizados na Condição 3 – RotaRod.....	35
Figura 7. Expressão de c-Fos em lóbulo VI cerebelar.....	39
Figura 8. Expressão de c-Fos em amígdala basolateral.....	40
Figura 9. Expressão de c-Fos em córtex pré-límbico.....	41
Figura 10. Expressão de c-Fos em córtex infra-límbico.....	42
Figura 11. Expressão de c-Fos em giro denteado do hipocampo.....	43
Figura 12. Expressão de c-Fos em área CA1 do hipocampo.....	44
Figura 13. Expressão de c-Fos em área CA3 do hipocampo.....	45
Figura 14. Coeficiente de correlação de Pearson r.....	48

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Expressão de cFos/DAPI em diferentes estruturas do sistema nervoso central.....	49
--------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais.....67

SUMÁRIO

1. PREFÁCIO.....	16
2. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	18
2.1. REFERÊNCIAS – CONTEXTUALIZAÇÃO.....	20
3. MANUSCRITO.....	22
4. INTRODUÇÃO.....	23
5. OBJETIVOS.....	31
5.1. <i>Objetivo geral</i>	31
5.2. <i>Objetivos específicos</i>	31
6. METODOLOGIA.....	32
6.1. <i>Procedimentos éticos e local da pesquisa</i>	32
6.2. <i>Animais</i>	32
6.3. <i>Procedimentos comportamentais</i>	32
6.3.1. <i>Condição 1 - Caixa Moradia/Controle</i>	32
6.3.2. <i>Condição 2 – Esquiva Inibitória</i>	32
6.3.3. <i>Condição 3 – RotaRod</i>	34
7. IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	36
8. ANÁLISE DAS IMAGENS E QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE c-FOS.....	37
9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
10. RESULTADOS.....	39
10.1. <i>Cerebelo</i>	39
10.2. <i>Amígdala</i>	40
10.3. <i>Córtex pré-límbico</i>	40
10.4. <i>Córtex infra-límbico</i>	41
10.5. <i>Hipocampo – Giro denteado</i>	42
10.6. <i>Hipocampo – CA1</i>	43
10.7. <i>Hipocampo – CA3</i>	44
10.8. <i>Coeficiente de Correlação de Pearson r</i>	45
11. DISCUSSÃO.....	50
12. CONCLUSÃO.....	56
13. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE ANEXOS.....	57
----------------------	----

1. PREFÁCIO

Essa dissertação foi realizada seguindo as normas do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia e desenvolvida no Laboratório de Neurociências com colaboração do Laboratório de Imunohistoquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

A orientadora do presente projeto, Prof^a Dra. Anna Carolyn Lepesteur Gianlorenço, segue a linha de pesquisa de processos básicos, desenvolvimento e recuperação funcional do sistema nervoso e realiza pesquisas experimentais com camundongos sobre as potenciais funções motoras e não motoras do cerebelo, além da interação da estrutura encefálica com os sistemas histaminérgico e dopaminérgico. Além disso, também realiza pesquisas sobre avaliação e intervenção em indivíduos com Doença de Parkinson. Para tanto, segue com parceria internacional com o Departamento de Fisiologia da Universidade de Toronto através da pesquisadora Maithe Arruda Carvalho, PhD, e com o Dr Felipe Fregni, Diretor do Spaulding Neuromodulation Center, Harvard Medical School. O co-orientador do presente projeto, Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo, é coordenador do Laboratório de Pesquisa em Fisioterapia Neurológica, tendo como área de atuação o campo da plasticidade neuromuscular e avaliação e intervenção da Fisioterapia Neurofuncional no pós-AVC. Além disso, também possui experiência com Biologia Molecular e Imunohistoquímica em sua carreira acadêmica.

O discente pesquisador deste projeto, discente José Mário Prati, iniciou o Mestrado em Março de 2019. No primeiro e terceiro semestres, o discente realizou disciplinas referentes ao cumprimento de créditos do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da UFSCar. Ainda no primeiro semestre, o discente submeteu o projeto ao comitê de ética em pesquisa com animais da UFSCar e obteve posterior aprovação. No segundo semestre, o discente realizou a qualificação do projeto, no qual foi aprovado e sendo assim, deu início à coleta de dados. No decorrer do curso de Mestrado, o discente foi aperfeiçoando suas habilidades de trabalho fino com tecido nervoso e buscando por melhorias ao projeto.

Além dos objetivos geral e específicos do presente projeto, o mesmo também tem por objetivo contribuir com a literatura a respeito do entendimento sobre as potenciais funções do cerebelo que ainda não possuem evidências científicas concretas ou que ainda são desconhecidas. Existem inúmeras hipóteses sobre funções do cerebelo que abrangem

não só componentes motores, como também componentes emocionais e cognitivos, e sua participação com outras estruturas encefálicas.

a. Artigo desenvolvido a ser submetido para revista científica

O presente trabalho será submetido para apreciação na revista *Neuroscience Letters*. “Neuronal activation of cerebellum functional circuits in non motor and motor functions in mice”

b. Orientação de alunas de Especialização em Fisioterapia Neurofuncional

Orientação de trabalho de conclusão de curso de alunas de Especialização em Fisioterapia Neurofuncional. Alunas: Mayene Souza Arrebola; Liangela Gonçalves Bortolotto. “Instrumentos de avaliação de déficits motores, cognitivos e comportamentais em indivíduos com Doença de Huntington”.

c. Indicadores e informações acadêmicas

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3837528410213126>

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7077-0161>

2. CONTEXTUALIZAÇÃO

O cerebelo é uma estrutura do sistema nervoso supra-segmentar, derivado da parte dorsal do metencéfalo e situado dorsalmente ao bulbo e a ponte, contribuindo para a formação do teto do IV ventrículo. Anatomicamente, distingue-se no cerebelo uma porção ímpar e mediana, o vérmis, ligado a duas massas laterais, os hemisférios cerebelares (MACHADO, 2005).

O neuroanatomista Olof Larsell (1886-1964) propôs a subdivisão do cerebelo em dez lobos. O lobo anterior corresponde às regiões de Larsell I, II, III, IV e V. (DAMIANI et al., 2016). Os lóbulos cerebelares I a V, parecem estar mais envolvidos com o córtex sensorio-motor, enquanto os lóbulos VI até parte do lóbulo IX parecem estar mais envolvidos com córtices associativos. O lóbulo X está mais envolvido com núcleos vestibulares, não possuindo conexão significativa com áreas corticais. (WITTER e DE ZEEUX, 2015).

A compreensão da atuação do cerebelo em funções motoras demonstra que a estrutura participa do controle postural, da modulação do movimento voluntário e da função vestibular (MIDDLETON e STRICK, 1998). De acordo com Miterko e colaboradores (2019) o cerebelo participa de comportamentos motores que abrangem a coordenação, equilíbrio, aprendizado e adaptação, embora os mecanismos de tais funções ainda necessitam ser esclarecidos.

Com o avanço tecnológico em neuroimagem e modelos computacionais, têm se permitido demonstrações de que o cerebelo é ativado em funções não motoras, como organização espacial, memória visual e de longo prazo. (GORDON, 2007). Além da sua participação em funções de caráter cognitivo, estudos têm demonstrado a ligação bidirecional do cerebelo com áreas envolvidas na regulação emocional (TURNER et al., 2007; MIDDLETON e STRICK, 2001). De acordo com Turner e colaboradores (2007), o cerebelo é fortemente conectado com áreas límbicas como amígdala, hipocampo e núcleo septal. O cerebelo está ligado a áreas associativas dos hemisférios cerebrais relacionadas à processamento emocional como regiões pré-frontal e límbica. (BUGALHO et al., 2006).

O hipocampo é uma estrutura localizada no lobo temporal de ambos os hemisférios cerebrais. Participa de funções cognitivas como aprendizado e memória e está envolvido com a resposta ao estresse (JOCA et al., 2003). Pouco se sabe sobre a conexão do cerebelo com o hipocampo, entretanto, um estudo recente demonstrou uma

conexão cerebelo-hipocampo via tálamo laterodorsal e ventrolateral para o córtex retrosplenial e córtex entorrinal. Segundo os autores, esses achados reforçam a noção do envolvimento do cerebelo em funções cognitivas, como navegação espacial por meio de um circuito polissináptico. (BOHNE et al., 2019).

Estudos experimentais sugerem que o cerebelo está envolvido no condicionamento de reações aversivas específicas e no condicionamento de reações aversivas inespecíficas. (TIMMANN et al., 2010). Autores sugerem que o cerebelo participa da manutenção e/ou reativação de memórias aversivas, além da participação cerebelar na aprendizagem de memórias aversivas, mesmo com a inativação da amígdala, que está relacionada com processamentos emocionais. (SACCHETTI et al., 2007).

O córtex pré-frontal desempenha um papel fundamental na memória. Também tem como função a tomada de decisões, incluindo monitoramento de conflitos, detecção de erros, controle executivo, aprendizado guiado por recompensa e tomada de decisão sobre risco e recompensa. (EUSTON et al., 2012). Balsters et al. (2010) sugerem conexões recíprocas entre cerebelo e córtex pré-frontal medial, além da participação de regiões Crus I e Crus II no armazenamento de representações que podem ser implantadas durante operações cognitivas qualificadas.

De forma geral, tanto funções motoras, mas principalmente funções não motoras do cerebelo, não estão bem elucidadas. A carência de evidências a respeito da participação cerebelar e das conexões do cerebelo com outras estruturas encefálicas motivaram a realização deste trabalho.

Descrição da dissertação para público leigo: O presente projeto estudou camundongos em diferentes condições que avaliavam a aprendizagem motora, desempenho motor e a memória emocional. Dessa forma, buscamos compreender como o cerebelo participa dessas funções, assim como outras áreas do cérebro. Após os testes, realizamos um procedimento de imunofluorescência no tecido nervoso desses animais para que as células ficassem fluorescentes e fosse possível visualiza-las através de um microscópio acoplado em um computador. Foi realizada uma contagem das células fluorescentes e uma correlação entre as estruturas analisadas referente à quantidade de células que apresentaram ativação. Não encontramos diferença na ativação do cerebelo nas diferentes condições. Além disso, foi encontrada forte ativação em áreas cerebrais responsáveis pelo processamento emocional na tarefa que avaliamos aprendizagem motora e desempenho motor. Isso implica que os animais apresentaram sinais emocionais na realização da tarefa motora e esses sinais podem afetar a execução e aquisição de habilidades motoras.

2.1. REFERÊNCIAS – CONTEXTUALIZAÇÃO

BALSTERS J. H.; CUSSANS E.; DIEDRICHSEN J.; PHILLIPS K. A.; PREUSS T. M.; RILLING J. K.; RAMNANI N.; Evolution of the cerebellar cortex: The selective expansion of prefrontal-projecting cerebellar lobules; **NeuroImage**; 49(3): 2045-2052; doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.10.045; 2010.

BOHNE P.; SCHWARZ M. K.; HERLITZE S.; MARK M. D.; A new projection from the deep cerebellar nuclei to the hippocampus *via* the ventrolateral and laterodorsal thalamus in mice; **Frontiers in Neural Circuits**; vol. 13, p. 51; 2019.

BUGALHO, P. et la.; Papel do Cerebelo nas funções cognitivas e comportamentais: Bases científicas e Modelos de estudo. **Acta Médica Portuguesa**, v. 9, p. 257-268, 2006.

DAMIANI D. et al.; Aspectos neurofuncionais do cerebelo: o fim de um dogma; **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia**; 35:39-44; doi: 10.1055/s-0035-1570498; 2016.

EUSTON D. R.; GRUBER A. J.; MC NAUGHTON B. L.; The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making; **Neuron**; 76(6): 1057-1070; doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.002; 20/Dec, 2012.

GORDON, N. The cerebellum and cognition; **European Journal of Paediatric Neurology**; v. 11, p. 232-234, 2007.

JOCA S. R.; PADOVAN C. M.; GUIMARÃES F. S.; Estresse, depressão e hipocampo; **Revista Brasileira de Psiquiatria**; 25(supl II): 46-51; 2003.

MACHADO, A. B. M.; Neuroanatomia Funcional Cerebelo: Anatomia Macroscópica e Divisões; Cap. 6; 2º edição: São Paulo; Editora Atheneu; 2005.

MIDDLETON, F. A.; STRICK, P. L. The cerebellum: an overview; **Trends in Neuroscience**; 21(9): 367-369; doi: 10.1016/S0166-2236(98)01330-7; 1998.

MIDDLETON, F. A.; STRICK, P. L. Cerebellar projections to the prefrontal cortex of the primate; **The Journal of Neurosciences**; v. 5, p. 700-712; doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-02-00700.2001; 2001.

MITERKO, L. N. et al.; Consensus paper: Experimental Neurostimulation of the Cerebellum; **The Cerebellum**; doi: 10.1007/s12311-019-01041-5; Jun/2019.

SACCHETTI B.; SACCO T.; STRATA P.; Reversible inactivation of amygdala and cerebellum but not perirhinal cortex impairs reactivated fear memories; vol. 25, pp. 2875-2884; doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05508.x; 2007.

TIMMANN D.; DREPPER J.; FRINGS M.; MASCHKE M.; RICHTER S.; GERWIG M.; KOLB F. P.; The human cerebellum contributes to motor, emotional and cognitive associative learning: A review; **Cortex**; 46(7): 845-857; doi: <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2009.06.009>; 2010.

TURNER B. M. et al.; The cerebellum and emotional experience; **Neuropsychology**; v. 45(6): 1331-1341; doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2006.09.023; 2007.

WITTER L.; DE ZEEUW C. I.; Regional functionality of the cerebellum; **Current Opinion in Neurobiology**; vol. 33, pp. 150-155; doi: 10.1016/j.conb.2015.03.017; 2015.

3. MANUSCRITO

“Ativação neuronal de circuitos funcionais do cerebelo em funções motoras e não motoras de camundongos”

José Mário Prati ¹; Anna Carolyna Lepesteur Gianlorenço ¹; Thiago Luiz de Russo ²; Evelyn Maria Guilherme ¹

Submissão à revista científica “Neuroscience Letters”

1. Laboratório de Neurociências, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos
2. Laboratório de Pesquisa em Fisioterapia Fisioterapia Neurológica, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos

4. INTRODUÇÃO

O cerebelo é uma estrutura do sistema nervoso supra-segmentar, derivado da parte dorsal do metencéfalo e situado dorsalmente ao bulbo e a ponte, contribuindo para a formação do teto do IV ventrículo. Anatomicamente, distingue-se no cerebelo uma porção ímpar e mediana, o vérmis, ligado a duas massas laterais, os hemisférios cerebelares (MACHADO, 2005).

O neuroanatomista Olof Larsell (1886-1964) propôs a subdivisão do cerebelo em dez lobos. O lobo anterior corresponde às regiões de Larsell I, II, III, IV e V. O lobo posterior corresponde às regiões de Larsell VI, VII, VIII e IX. O lobo flóculo-nodular corresponde à região de Larsell X. Essa divisão realizada por Larsell facilitou a tarefa de identificar e compreender a apresentação clínica dos sintomas associados a lesões cerebelares (DAMIANI et al., 2016).

Os lóbulos cerebelares I a V, parecem estar mais envolvidos com o córtex sensorio-motor, enquanto os lóbulos VI até parte do lóbulo IX parecem estar mais envolvidos com córtices associativos. O lóbulo X está mais envolvido com núcleos vestibulares, não possuindo conexão significativa com áreas corticais. (WITTER e DE ZEEUX, 2015).

Damiani e colaboradores (2016) relatam uma subdivisão clássica em sua revisão, em que o arquicerebelo está relacionado ao controle do sistema vestibular e recebe aferências dos canais semicirculares e órgãos otolíticos, bem como dos núcleos vestibulares situados no tronco encefálico lateral, medial, superior e inferior. O paleocerebelo está relacionado ao controle da propriocepção e recebe aferências da medula espinal (vias espinocerebelares anteriores e posteriores), além de aferências visuais e auditivas. O vermis está relacionado à propriocepção do esqueleto axial (tronco e porções proximais dos membros), enquanto porções mediais dos hemisférios correlacionam-se com a propriocepção das extremidades proximais dos membros superiores e inferiores. O neocerebelo contém maior núcleo presente do cerebelo, o núcleo denteado, este está relacionado com a programação motora e cognição. O neocerebelo recebe aferências de todo o córtex cerebral através de núcleos pontinos, constituindo a via córtico-pontocerebelar e envia fibras eferentes para o núcleo rubro, tálamo e córtex cerebral: área motora, pré-motora e córtex pré-frontal.

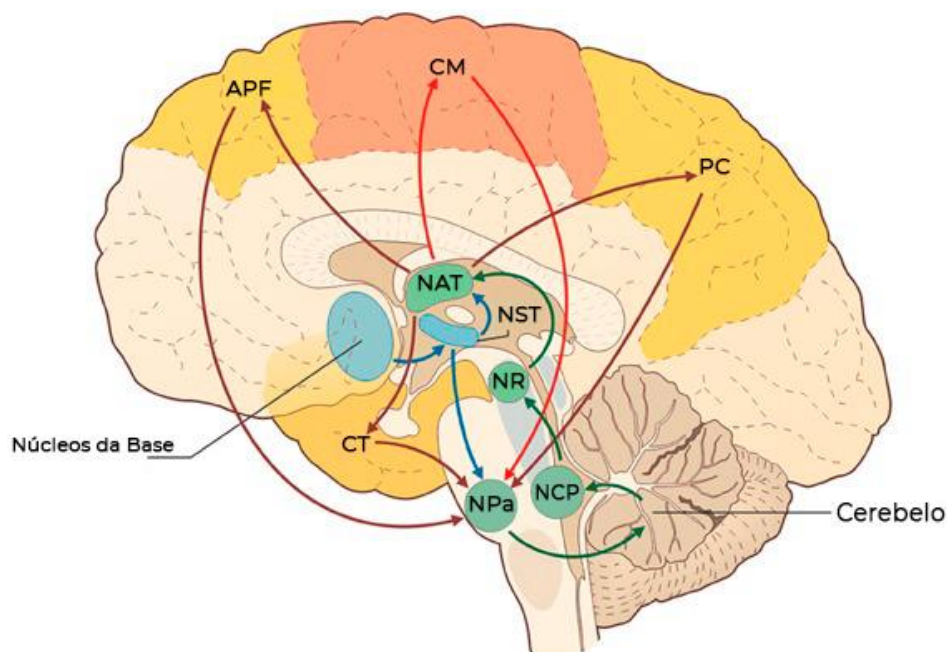


Figura 1: Circuito cerebelo-tálamo-cérebro-cortical.

Adaptado de D'Angelo e Casali (2013)

Abreviações: APF, área pré-frontal; CM, córtex motor; CT, córtex temporal; NAT, núcleo anterior tálamo; NCP, núcleo cerebelar profundo; NPa, núcleo pontino anterior; NR, núcleo rubro; NST, núcleo subtalâmico; PC, córtex parietal.

Casartelli e colaboradores (2017) estudaram sobre o planejamento motor de segunda ordem em um paciente com um caso raro de agenesia cerebelar. Os resultados mostraram que o planejamento motor de segunda ordem foi preservado, mesmo com o déficit nas habilidades motoras finas. O planejamento motor de segunda ordem se trata de um ajuste em relação à tarefa motora primária, o que se faz necessário para otimizar o objetivo final da tarefa a ser realizada (DOMELLÖF et al., 2019). Este resultado sugere novas especulações sobre o papel do cerebelo nas habilidades de planejamento motor.

A compreensão da atuação do cerebelo em funções motoras demonstra que a estrutura participa do controle postural, da modulação do movimento voluntário e da função vestibular (MIDDLETON e STRICK, 1998). De forma automática, o cerebelo contribui para o processamento sensório-motor. Após receber, analisar e reconhecer um padrão sensorial ou motor, o cerebelo produz correções de ganho e fase que permitem regular a força e ativação de grandes conjuntos de músculos (ALBUS, 1971 apud D'ANGELO e CASALI, 2013). De acordo com Miterko e colaboradores (2019) o cerebelo participa de comportamentos motores que abrangem a coordenação, equilíbrio,

aprendizado e adaptação, embora os mecanismos de tais funções ainda necessitam ser esclarecidos.

As pesquisas sobre as funções do cerebelo ampliaram de forma considerável durante as últimas décadas. A maioria dos pesquisadores em neurologia acreditava que o cerebelo estava envolvido apenas com o controle do movimento. Porém, nos últimos anos, avanços em neurociências, em tecnologias de imagem e modelos computacionais, têm permitido repetidas demonstrações de que o cerebelo participa de funções motoras e não motoras (KOZIOL et al., 2013; TAVANO e BORGATI, 2010; SCHMAHMANN et al. 2007; BUGALHO et al., 2006; ENGELBARDT E. e MOREIRA D. M.; 2009).

O lobo flóculo-nodular, o vérmis cerebelar, o núcleo fastigial e o núcleo globoso são descritos como as regiões participativas pela cognição e emoção. Tais áreas cerebelares são consideradas responsáveis pelos mecanismos primitivos de preservação, como manifestações de luta, emoção, sexualidade e, possivelmente, de memória emocional. Os hemisférios cerebelares são descritos como supostos responsáveis pela aprendizagem. (ESPERIDIÃO et al., 2008)

Estudos sobre déficits neuropsicológicos em pacientes com lesões cerebelares, ativação do cerebelo em indivíduos normais durante a realização de tarefas cognitivas e conexões anatômicas mostrando as ligações do cerebelo com outras estruturas e com o córtex cerebral suportam essa visão (SCHMAMANN et al., 2007; BUGALHO et al., 2006). A utilização de exames de neuroimagem têm confirmado que o cerebelo é ativado em vários processos cognitivos, como a organização espacial, memória visual e de longo prazo, e a perturbação destas funções após danos cerebelares pode ser devido a uma ruptura de projeções cérebro-cerebelares (GORDON, 2007).

Popa e colaboradores (2014) sugeriram que a participação do cerebelo em funções motoras e não motoras estaria relacionada à sua arquitetura uniforme e a um modo comum de processamento das informações. Os autores correlacionaram resultados eletrofisiológicos dos sinais motores no córtex cerebelar com observações em domínios não motores, e sugeriram que o córtex cerebelar tem grande capacidade de estabelecer associações entre diferentes sinais sensoriais, motores e não motores. De acordo com os autores, os resultados de estudos sobre como as células de Purkinje codificam os sinais de movimentos indicam que a circuitaria do córtex cerebelar suporta aprendizagem associativa, sequenciamento, memória de trabalho e modelos internos de domínios não motores.

Estudos têm mostrado a ligação bidirecional do cerebelo com áreas envolvidas na regulação emocional (TURNER et al., 2007; MIDDLETON e STRICK, 2001). Segundo Turner e colaboradores (2007), o cerebelo é fortemente conectado com o sistema reticular, áreas corticais associativas e áreas límbicas, como amígdala, hipocampo e núcleo septal. De acordo com Bugalho e colaboradores (2006), o cerebelo está ligado a áreas associativas dos hemisférios cerebrais (regiões pré-frontal, occipito-parietal, temporal e límbica).

Nossa hipótese é que o cerebelo participa de funções cognitivas em níveis hierárquicos diferentemente da sua participação em funções motoras, se comunicando com outras áreas encefálicas envolvidas nos processos de memória emocional e aprendizagem motora, sendo elas o hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal medial (córtex infra-límbico e córtex pré-límbico).

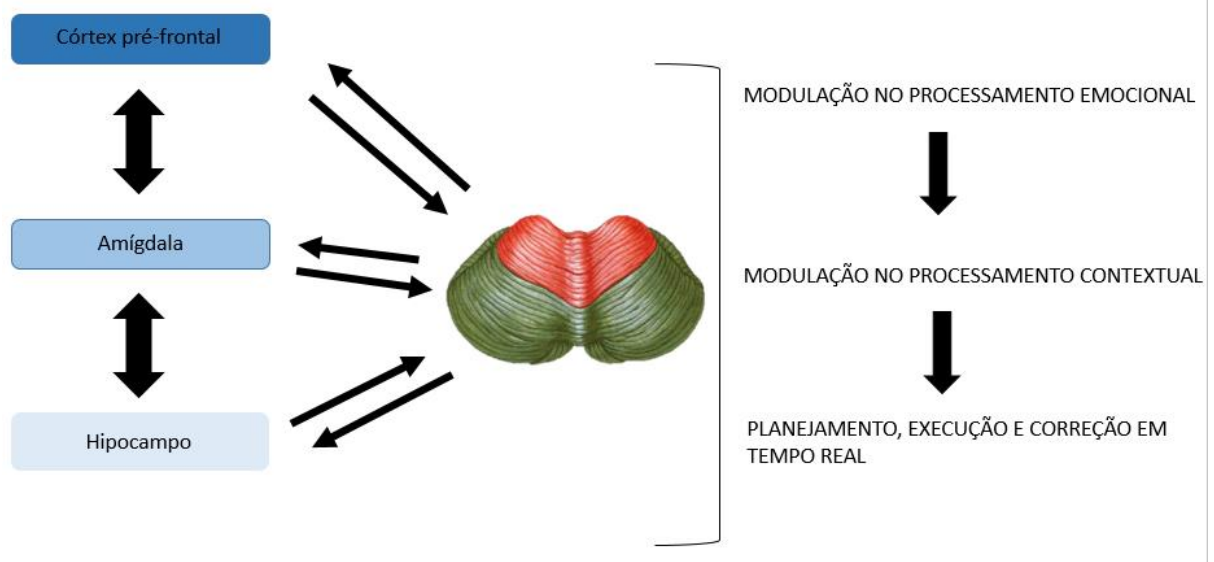


Figura 2. Figura representativa da comunicação do cerebelo com outras estruturas encefálicas.

Figura representativa demonstrando nossa hipótese sobre os diferentes níveis hierárquicos na participação do cerebelo na função de estruturas encefálicas relacionadas à cognição, enfatizando através de cores mais escura para mais clara, a hierarquia da participação do cerebelo nas funções das outras estruturas. As resultantes desse circuito supostamente seriam a modulação de processamentos emocional e contextual, obtendo como produto final, o planejamento, execução e correção em tempo real sobre ações refinadas e cronometradas qualitativamente, o que resultaria em aprendizagem e memória emocional frente às repetidas exposições.

O hipocampo está localizado no lobo temporal de cada hemisfério encefálico e está relacionado a processos cognitivos como aprendizado e memória, além de estar

envolvido com a resposta ao estresse. Ele é ativado por diferentes estressores e participa do processamento de informações sobre eventos ameaçadores (JOCA et al., 2003). O hipocampo também mostra ter um papel seletivo no medo de estímulos contextuais, como por exemplo, aprender sobre onde os choques elétricos foram causados (MAREN, 2008). Mezzasalma e colaboradores (2004) citam em sua revisão que é praticamente intuitivo que um roedor evita entrar em uma jaula onde foi anteriormente submetido a um estímulo aversivo e essa situação se assemelha a um paciente que se recusa a atravessar uma ponte sobre a qual já sofreu um ataque de pânico.

De acordo com Grossberg e Merrill (1996), hipocampo e cerebelo coordenam processos de aprendizagem através de circuitos que aprendem a adaptar o tempo de saídas. O tempo do hipocampo ajuda a manter a atenção em objetos de objetivo motivacionalmente salientes durante atrasos variáveis relacionadas à tarefa, enquanto o tempo cerebelar controla a liberação de respostas condicionadas. Este modelo sugere que mecanismos do hipocampo que ajudam a chamar rapidamente a atenção para pistas salientes poderia liberar comandos motores prematuros se não houvesse a liberação de comandos adaptativamente cronometrados pelo cerebelo. Iglói e colaboradores (2015) sugerem que o cerebelo não se limita ao processamento sensório-motor e que em especial o lóbulo VIIA, possui coativações funcionais com o hipocampo.

A amígdala é um complexo de núcleos que se encontra no lobo temporal anterior de seres humanos e de outros animais (DA SILVA, 2016). É uma região cerebral importante para o processamento emocional e é responsável pela detecção, geração e manutenção das emoções relacionadas ao medo, além do reconhecimento de expressões faciais de medo e coordenação de respostas apropriadas à ameaça e perigo. A amígdala não é ativada apenas em processos que envolvem a sensação de medo, mas também durante o reconhecimento de expressões faciais de alegria, levando à conclusão de que a amígdala está envolvida na resposta a estímulos de importância emocional, independente de seu contexto agradável ou desagradável. (ESPERIDIÃO, 2008)

Sacchetti e colaboradores (2007) sugerem a participação do cerebelo na manutenção e/ou reativação de memórias aversivas e que a participação cerebelar vai além de uma pura regulação das repostas motoras ou sua associação com eventos de medo. Os autores também demonstraram que a inativação da amígdala não elimina as memórias de medo forte e que esse efeito deve ser causado pelo cerebelo. O cerebelo adquire uma representação de medo durável devido ao forte aprendizado, o que se torna suficiente para suportar os processos de memória na ausência da amígdala. Em um estudo

mais recente, Farley e colaboradores (2016) sugerem que mecanismos de aprendizagem cerebelar são atenuados com a inativação da amígdala central.

O córtex pré-frontal medial é constituído por córtex cingulado, córtex subcaloso e giro frontal medial. Está bem conectado com a amígdala e está envolvido no processo de extinção do medo, na retenção da extinção, na reatividade emocional e na regulação autonômica (SHIN et al., 2006; MORGAN et al., 1993). Esta estrutura desempenha um papel fundamental na memória, por seu envolvimento seletivo na recuperação de memórias remotas, além de sua função na consolidação de memórias. O córtex pré-frontal medial também tem como função a tomada de decisões, incluindo monitoramento de conflitos, detecção de erros, controle executivo, aprendizado guiado por recompensa e tomada de decisão sobre risco e recompensa. As teorias da função do córtex pré-frontal medial enfatizaram seu papel na tomada de decisão adaptativa, no qual ele orienta as decisões antecipando os resultados emocionais. Com base em evidências anatômicas e eletrofisiológicas, propõe-se que esta estrutura tome como entrada o contexto e os eventos atuais e preveja a resposta mais adaptativa com base na experiência passada (EUSTON et al., 2012)

O cerebelo supostamente participa da modulação de funções consideradas como domínio do lobo frontal como planejamento, sequenciamento, previsão, julgamento, atenção, linguagem, memória espacial e memória de trabalho, através de conexões pré-frontopontinas que são uma parte essencial do substrato anatômico para essa suposta modulação cerebelar (SCHMAHMANN e PANDYA, 1995). De acordo com Balsters et al. (2010), o córtex pré-frontal incorpora circuitos plásticos em Crus I e Crus II para armazenar representações que podem ser implantadas durante operações cognitivas qualificadas. Watson e colaboradores (2014) sugerem que lesões em região vermal do cerebelo podem contribuir para doenças neuropsiquiátricas que estão associadas ao mau funcionamento neocortical e à neuromodulação de dopamina.

McNaughton e Coor (2004) relatam que a expressão de uma determinada função ocorre em um processo integrado e sinérgico entre diferentes estruturas do sistema nervoso central, que agem em diferentes vias e níveis hierárquicos. Os autores sugerem que o controle neuropsicológico de comportamentos de medo e ansiedade, depende dos diferentes estímulos aversivos e resultam da ativação de diferentes níveis hierárquicos de um mesmo sistema defensivo.

As ligações entre o cerebelo e as diversas áreas encefálicas indica um papel modulador da atividade sináptica dos circuitos funcionais nas diferentes funções. Após

determinados estímulos, uma sequência de eventos ocorre no neurônio que por fim, levam à transcrição de proteínas que apresentam afinidade de ligação ao DNA, provocando a ativação de seus genes alvos. (PRADO e DEL BEL, 1998)

Existem genes que são ativados rapidamente após estimulação celular e sua expressão não pode ser prevenida pelos inibidores da síntese proteica, sendo um desses genes, o c-Fos. (HERRERA e ROBERTSON, 1996). O gene c-Fos pertence a um grupo de genes de expressão imediata (IEGs). A expressão de c-Fos é rapidamente induzida por diferentes tipos de estímulos, em vários tipos de células, independente da síntese proteica. O c-Fos também é induzido em condições de plasticidade neuronal a longo prazo, incluindo aprendizagem e memória (JAWORSKI et al, 2018; HERRERA e ROBERTSON, 1996).

Para desenvolver mudanças de longo prazo, faz-se necessário a síntese de proteína. Sendo um dos primeiros IEG's estudados, o papel de c-Fos na aprendizagem e memória foi investigado mais profundamente do que outros IEG's (HERRERA e ROBERTSON, 1996)

Segundo Berghorn e colaboradores (1994), a maioria dos neurônios expressa pouco ou nenhum c-Fos em condições basais, porém em respostas à estímulos, os neurônios expressam rapidamente o c-Fos e é comprovada a utilização da coloração de c-Fos para marcação de neurônios ativados sob uma condição estimulada.

A expressão gênica de c-Fos logo se tornou uma das técnicas mais comumente usadas para marcadores de ativação neuronal e seu mapeamento fornece resolução de célula única com baixa expressão e plano de fundo. (JAWORSKI et al, 2018). No estudo de Wang e colaboradores (2016) foram encontrados resultados a partir da expressão de c-Fos que indicam que o hipocampo, o núcleo central da amígdala e a região ventromedial do corpo estriado estão envolvidos no processo de aprendizagem e memória. Além disso, os resultados demonstraram novos caminhos funcionais e estruturais através dessas áreas cerebrais. Os autores ainda relatam que essas recém-descobertas podem acrescentar novas dimensões às redes neurais envolvidas na aprendizagem e memória e sugerem o desempenho de papéis dessas redes neurais na patogênese da demência e Doença de Alzheimer. Keiser e colaboradores (2017) realizaram testes com camundongos machos e fêmeas onde os animais recebiam choque elétrico nas patas. Os resultados demonstraram forte atividade de c-Fos em hipocampo dorsal e amígdala basal, sugerindo que estas estruturas podem contribuir para recuperação do medo do contexto e generalização da memória associada ao medo.

Em estudo analisando a ativação de c-Fos no cerebelo, Gas e colaboradores (2017) realizaram microinjeção de cloridrato de cocaína em camundongos e testes de preferência com estímulos olfativos associados com cocaína. Os resultados indicaram a formação de memórias de preferência em células granulares no ápice do córtex cerebelar, o que sugere que o cerebelo é uma região importante para a persistência de memórias relacionadas à droga.

Babayan e colaboradores (2017) investigaram a arquitetura cognitiva subjacente ao processamento de automovimento durante a exploração e o comportamento direcionado ao objetivo. A análise pós-comportamental utilizou a expressão de c-Fos para caracterização da rede cerebral. O estudo revelou uma rede dominada pela atividade do hipocampo e cerebelo que parecia sustentar uma navegação baseada em sequência. Este resultado demonstrou que cerebelo e hipocampo ocupam uma posição central no surgimento de ações direcionadas a um objetivo a partir da organização espaço-temporal da informação de movimento próprio. Os autores também destacaram como a memória dependente do hipocampo pode ser funcionalmente associada à atividade do cerebelo além de seu aspecto motor.

Em estudo de Tronel e Sara (2002), foi encontrada ativação de c-Fos em córtex pré-límbico, córtex orbital ventrolateral e amígdala basolateral relacionada à aprendizagem associativa. Isso indica que essas regiões atuam em conjunto para consolidar a memória sobre contingências de estímulo-resposta-reforço. Além disso, os autores sugerem um papel da habenula lateral na recuperação de informações sobre associações estímulo-recompensa.

Estudos analisando a ativação neuronal de circuitos cerebelares em funções motoras e não motoras são escassos na literatura. O conhecimento sobre o papel do cerebelo em suas funções contribui para o entendimento da base neurobiológica do processamento de circuitos cerebelares, o que proporciona uma melhor visualização dos aspectos fisiológicos e das manifestações clínicas nas disfunções cerebelares.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Analisar a ativação neuronal dos circuitos funcionais do cerebelo e outras estruturas encefálicas relacionadas às funções motoras e não motoras.

5.2. Objetivos específicos

- Analisar a expressão de c-Fos no cerebelo (lóbulo VI), após exposição dos animais ao RotaRod e modelo de Esquiva Inibitória.
- Analisar os circuitos funcionais nas seguintes áreas cerebrais: amígdala, hipocampo (CA1, CA3, giro denteado) e córtex pré-frontal (córtex pré-límbico e córtex infra-límbico).
- Traçar possíveis circuitos encefálicos envolvidos nos processos de memória emocional, desempenho e aprendizagem motora.

6. METODOLOGIA

6.1. *Procedimentos éticos e local da pesquisa*

O projeto de pesquisa foi enviado ao Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (protocolo: 2401120819). A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia com a colaboração do Laboratório de Imunohistoquímica e Biologia Molecular na Universidade Federal de São Carlos.

6.2. *Animais*

Foram utilizados 16 camundongos ingênuos (Suíço Albino) pensando entre 25 e 35 g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos. Os animais foram agrupados em 4 animais por caixa (31x20x13 cm) e ficaram em ambientes com ciclo de luz de 12 horas, temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade controlados. Antes do início dos experimentos, os animais foram gentilmente manipulados (tocar e segurar os animais com as mãos) por 2 minutos durante 5 dias para habituação com o manuseio do experimentador. Alimento e água estiveram disponíveis, exceto durante as breves sessões dos testes. O experimento foi realizado na fase clara, no período entre 8 e 14 horas.

6.3. *Procedimentos comportamentais*

6.3.1. *Condição 1 – Caixa moradia/Controle*

Quatro animais fizeram parte da Condição 1, no qual permaneceram em sua caixa moradia por 21 dias, mantidos em ambiente controlado até passarem pelos procedimentos de perfusão transcardíaca e extração encefálica.

6.3.2. *Condição 2 – Esquiva Inibitória*

Para esse procedimento foi utilizada a caixa de Esquiva Inibitória confeccionada em acrílico (48x24,4x25cm) composta por dois compartimentos de mesma dimensão: um claro, sob iluminação de 450 lx, e outro escuro, com acrílico preto dotado de tampa (1 lx). Uma abertura na forma de porta guilhotina de 10x9 cm (base x altura) localiza-se ao nível do piso e no centro da divisão dos dois ambientes; seu acionamento se dá através do programa instalado em computador em resposta aos sensores de infravermelho. O piso é constituído por barras de aço inoxidável (2,5 mm de diâmetro) distanciadas 1 cm entre si, que liberam choques elétricos. Os animais foram transportados individualmente para

o laboratório e foram deixados neste ambiente por pelo menos 1 hora antes do início do procedimento.

Cinco animais fizeram parte da Condição 2, no qual realizaram o treino de Esquiva Inibitória e foram expostos inicialmente à sessão de habituação. Na sessão de habituação, os camundongos foram colocados na sala de experimentação uma hora antes do início dos testes. Cada animal foi transportado individualmente até a caixa e posicionado no centro do compartimento iluminado por 5 segundos. A porta guilhotina foi aberta e foi mensurado o tempo de resposta para o animal atravessar do compartimento claro para o compartimento escuro foi medido. Após o animal atravessar com as 4 patas para o compartimento escuro, a porta guilhotina foi fechada e o animal foi retirado do aparato.

Após 30 minutos, foi realizada a sessão de aquisição. Nesta sessão, imediatamente após o animal entrar no compartimento escuro, a porta guilhotina foi fechada e foi liberado choque elétrico nas patas (0,5mA por 3s). Após o choque elétrico, o animal ficou confinado no compartimento escuro por 20s, foi retirado do aparato e colocado na gaiola. Vinte e quatro horas após a sessão de aquisição, foi realizada a sessão de consolidação, onde foi seguido o mesmo procedimento da sessão de aquisição. Se o animal não atravessasse para o compartimento escuro em até 120s, indicava que houve consolidação da resposta de Esquiva Inibitória. Nenhum animal foi excluído do estudo, independente da ação executada durante o processo de experimentação descrito. Após a realização da sessão de consolidação, os animais passaram por eutanásia e perfusão transcardíaca.



Figura 3. Caixa de Esquiva Inibitória

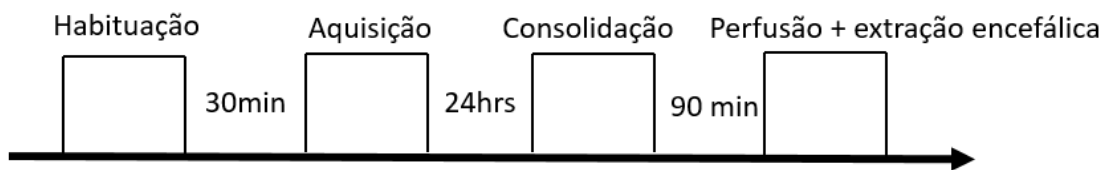


Figura 4. Figura representativa demonstrando uma linha do tempo referente aos procedimentos realizados na Condição 2 – Esquiva Inibitória.

6.3.3. Condição 3 – RotaRod

O RotaRod automatizado (Master One Suprimentos e Equipamentos para Laboratório) consiste em uma caixa de acrílico de 8 cm de diâmetro instalado transversalmente por cinco baias com 10 cm de distância entre uma e outra, e aproximadamente 20 cm de altura em relação ao piso do equipamento. A rotação do cilindro é promovida através de um motor. A latência de queda dos animais é mensurada automaticamente por meio de um sensor localizado na base do aparato.

Sete animais fizeram parte da Condição 3, no qual foram expostos à sessão de habituação e três sessões de aquisição. Na sessão de habituação, os camundongos foram colocados na sala de experimentação uma hora antes do início dos testes. Em seguida, foi iniciada a sessão de habituação, onde os camundongos foram posicionados no cilindro do aparato com a face voltada para a parede posterior do RotaRod, com velocidade crescente de 8 a 20rpm por 120s ou até caírem. Em seguida, os animais foram colocados em sua caixa moradia. Vinte e quatro horas após a sessão de habituação, foram iniciadas as sessões de aquisição.

Na sessão de aquisição, os camundongos foram colocados na sala de experimentação uma hora antes do início dos testes. Em seguida, foi iniciada a sessão de aquisição, que foi repetido os procedimentos de posicionamento do animal no aparato e iniciado o teste com 8rpm iniciais com rotação crescente até 20rpm por até 5 minutos ou até o animal cair. Foram realizadas 3 sessões de aquisição, sendo divididas em sessão 1 e 2 em um dia e após vinte e quatro horas, sessão 3 e perfusão transcardíaca.



Figura 5. RotaRod automatizado

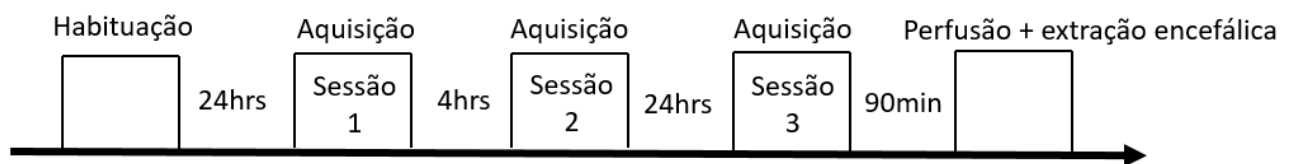


Figura 6. Figura representativa demonstrando uma linha do tempo referente aos procedimentos realizados na Condição 3 – RotaRod

7. IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os camundongos foram anestesiados com solução de Cloridrato de Cetamina (100mg/kg) e Xilasina (10mg/kg, i.p) no volume de 30 ml/kg e perfundidos 90 min após a exposição aos modelos, ou após serem retirados de suas caixas, no caso do grupo controle. Os animais foram perfundidos manualmente com tampão fosfato salina (PBS) 0,1M seguido de paraformoldeio (4%) com auxílio de uma seringa com capacidade de 20 ml. Os encéfalos foram removidos, fixados durante a noite, e transferidos para PBS 0,1M. As secções coronais (40µm) foram feitas em um vibrátomo em lóbulo VI cerebelar, amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal medial (córtex pré-límbico e córtex infra-límbico).

O protocolo seguiu as seguintes etapas: lavagem das secções em 1% H₂O₂ e PBS 1X por 30 minutos; 3 lavagens em PBS 1X por 2 minutos; incubação em anticorpo primário a 4°C (1:5000, rabbit anti-cFos em solução de bloqueio TNB) por 24 horas; 3 lavagens em PBS 1X por 2 minutos; incubação em anticorpo secundário (1:500, donkey anti-rabbit em solução de bloqueio TNB) por 60 minutos; 3 lavagens em PBS 1X por 2 minutos; amplificação TSA fluoresceína (1:100) em solução ácido bórico e 0,01% H₂O₂ em temperatura ambiente por 30 minutos; 3 lavagens em PBS 1X por 2 minutos; incubação em DAPI (1:1000) e PBS 1X por 10 minutos; 3 lavagens em PBS 1X por 2 minutos.

8. ANÁLISE DAS IMAGENS E QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE c-FOS

Foram realizadas secções coronais de 40 μm em um vibrátomo (Leica VT 1200S) no cerebelo correspondente ao lóbulo VI (bregma -7.05mm a -7.65mm), amígdala basolateral (bregma -1.05mm a -2.35mm), hipocampo áreas CA1 (-1.55 a -2.25mm), CA3 (-1.55mm a -2.35mm), giro denteado (bregma -1.55mm a -2.35mm), córtex infra-límbico (bregma 1.74mm a 2.24mm), córtex pré-límbico (1.64mm a 2.54mm), seguindo as coordenadas estereotáxicas de Allen Brain Atlas (2007). Foram realizadas coletas de uma amostra aleatória de cada núcleo e região encefálica de interesse para garantir que não haja influência na contagem de células para uma determinada região.

As secções foram visualizadas em um microscópio eletrônico (ImageXpress) com amplificação de 10x utilizando o software MetaXpress. (Molecular Devices, LLC) durante 30 horas, sendo coletadas 378 imagens. As amostras foram cegadas recebendo códigos (vermelho, verde e azul) e entregues à uma pesquisadora independente para que fosse feita a quantificação de c-Fos. Neurônios imunofluorescentes foram contados bilateralmente utilizando o software ImageJ (NIH Image) em um filtro de campo escuro.

9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados comportamentais foram analisados com o auxílio do software Graphpade Prism, versão 9.0 para Windows (Graphpade software, San Diego, Califórnia, EUA). Foi aplicada a análise de variância (ANOVA one-way) para avaliar a diferença da razão cfos/dapi entre os grupos que foram expostos ao protocolo de Esquiva Inibitória, RotaRod e os animais do grupo controle. Para verificar a diferença entre os grupos, foi utilizado o teste post hoc de Tukey. Além disso, realizamos um teste de Correlação de Pearson entre as diferentes áreas nas três condições. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes estatisticamente e valores de $p = 0,06$ foram considerados como tendência.

10. RESULTADOS

Foram utilizados 16 animais para análise da expressão de c-Fos nas diferentes regiões encefálicas. Segue apresentação dos resultados estatísticos em gráficos referentes à expressão de c-Fos em cerebelo, amígdala basolateral, córtex pré-límbico, córtex infra-límbico, hipocampo – giro denteado, hipocampo – CA1 e hipocampo – CA3, dos animais que foram expostos ao treino de Esquiva Inibitória, RotaRod e grupo Controle.

10.1. Cerebelo

Não foi identificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de Esquiva Inibitória, RotaRod e controle ($F_{2,13} = 1.263$; $p = 0.32$) em lóbulo VI, indicando que a exposição dos animais à caixa de Esquiva Inibitória e ao RotaRod não causou aumento da atividade neuronal cerebelar, em comparação com os animais do grupo controle.

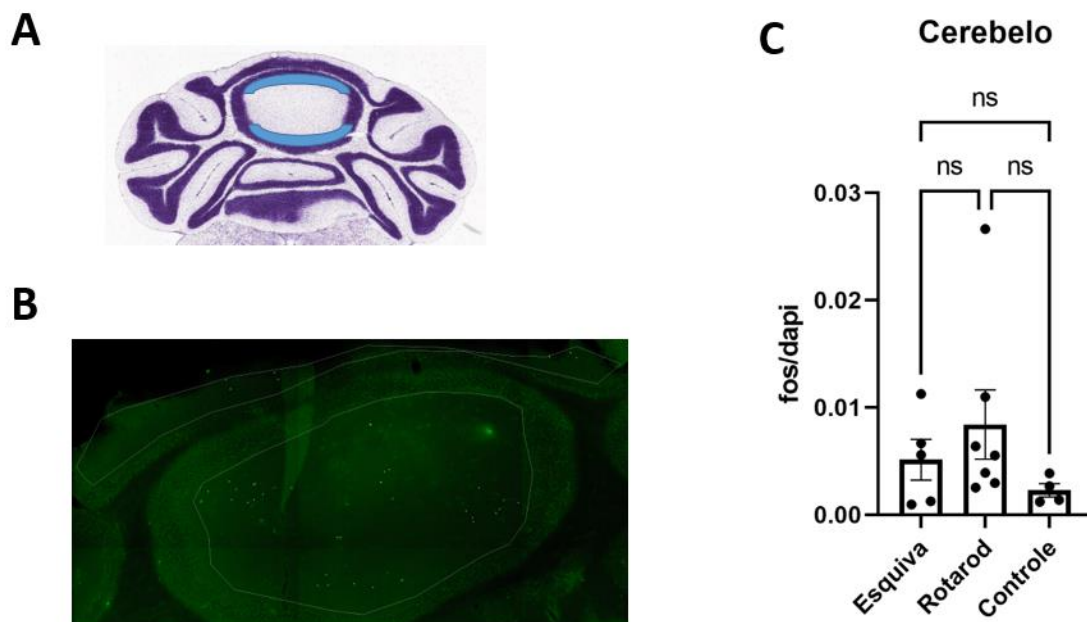


Figura 7. Expressão de c-Fos em lóbulo VI cerebelar – Bregma -7.25mm

A- Representação esquemática da estrutura selecionada para análise da expressão de c-Fos. **B-** Figura representativa da imunofluorescência de c-Fos em lóbulo VI cerebelar. **C-** Gráfico representativo da expressão de c-Fos em lóbulo VI cerebelar nas diferentes condições. As barras representam os valores de média e erro padrão da média da razão c-Fos/dapi. Os pontos indicam a dispersão de valores intra-grupo. Ns= não significativo.

10.2. Amígdala basolateral

Foi identificada diferença estatisticamente significativa na expressão de c-Fos em amígdala basolateral nos animais que foram expostos à caixa de Esquiva Inibitória e RotaRod. ($F_{2,13} = 5.257$; $p=0.02$). O post hoc de Tukey revelou que os animais do grupo controle apresentaram menor expressão de c-Fos quando comparados aos animais que foram expostos à Esquiva Inibitória ($p=0.049$) e ao RotaRod ($p=0.02$). Não houve diferença entre os animais dos grupos de Esquiva Inibitória e RotaRod ($p=0.96$).

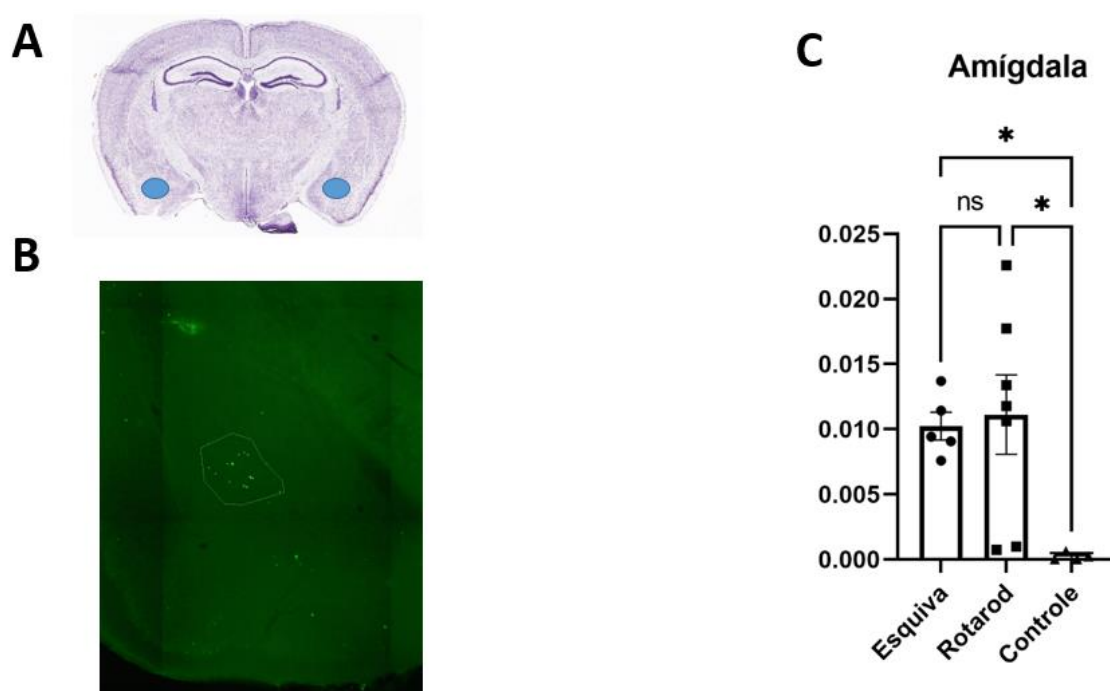


Figura 5. Expressão de c-Fos em amígdala basolateral – Bregma -1.85mm

A- Representação esquemática da estrutura selecionada para análise da expressão de c-Fos. **B-** Figura representativa da imunofluorescência de c-Fos em amígdala basolateral. **C-** Gráfico representativo da expressão de c-Fos em amígdala basolateral nas diferentes condições. As barras representam os valores de média e erro padrão da média da razão cfos/dapi. Os pontos (Esquiva), quadrados (Rotarod) e triângulos (controle), indicam a dispersão de valores intra-grupo. * indica $p<0.05$. Ns= não significativa.

10.3. Córtex pré-límbico

Foi identificada diferença estatisticamente significativa na expressão de c-Fos em córtex pré-límbico nos animais que foram expostos à caixa de Esquiva Inibitória e nos animais expostos ao RotaRod ($F_{2,11} = 9.930$; $p=0.003$). O post hoc de Tukey revelou que os animais do grupo controle apresentaram menor expressão de c-Fos quando comparados com os animais que foram expostos à Esquiva Inibitória ($p= 0.002$). Em contrapartida, na comparação entre os animais do grupo controle com os animais expostos

ao RotaRod, não houve diferença estatisticamente significativa. Já na comparação entre os animais que foram expostos à Esquiva Inibitória e ao RotaRod houve tendência à diferença ($p= 0.06$).

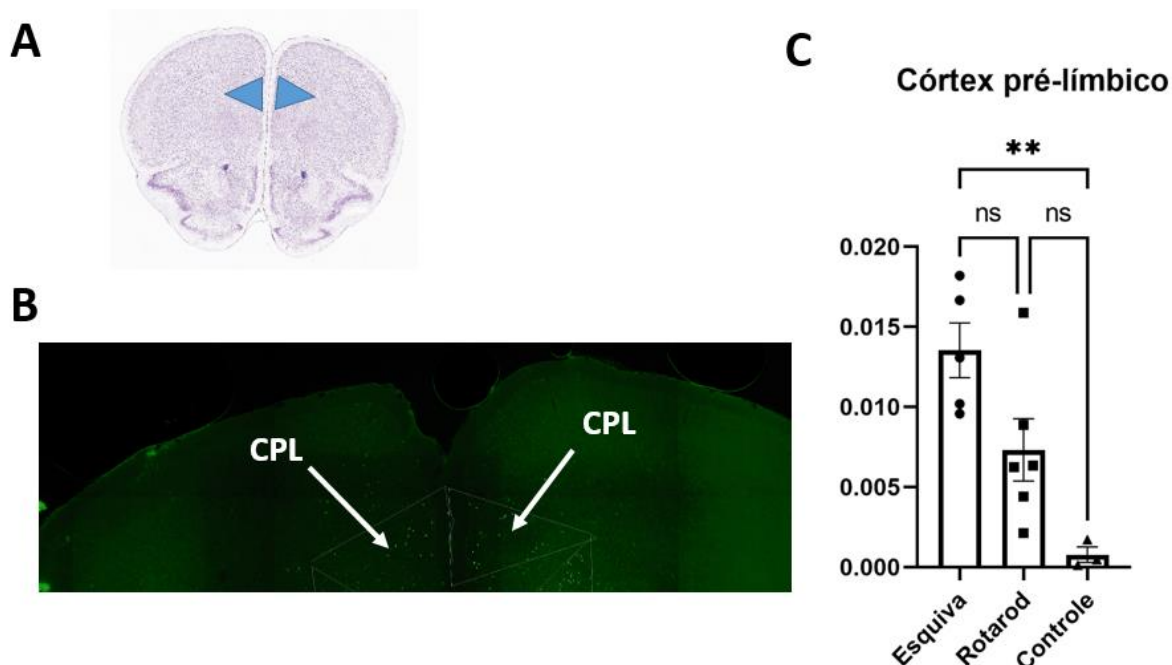


Figura 9. Expressão de c-Fos em córtex pré-límbico (CPL) – Bregma 1.94mm

A- Representação esquemática da estrutura selecionada para análise da expressão de c-Fos. **B-** Figura representativa da imunofluorescência de c-Fos em córtex pré-límbico (CPL). **C-** Gráfico representativo da expressão de c-Fos em córtex pré-límbico nas diferentes condições. As barras representam os valores de média e erro padrão da média da razão cfos/dapi. Os pontos (Esquiva), quadrados (Rotarod) e triângulos (controle), indicam a dispersão de valores intra-grupo. ** indica $p<0.01$. Ns= não significativa.

10.4. *Córtex infra-límbico*

Foi identificada diferença estatisticamente significativa na expressão de c-Fos em córtex infra-límbico nos animais que foram expostos à caixa de Esquiva Inibitória e ao RotaRod ($F_{2,11}=21.67$; $p= 0.0002$). O teste post hoc revelou que os animais do grupo controle apresentaram menor expressão de c-Fos quando comparados aos animais que foram expostos à Esquiva Inibitória ($p= 0.0001$) e ao RotaRod ($p= 0.04$). Também houve diferença significativa na comparação entre animais que foram expostos à Esquiva Inibitória e ao RotaRod ($p= 0.003$).

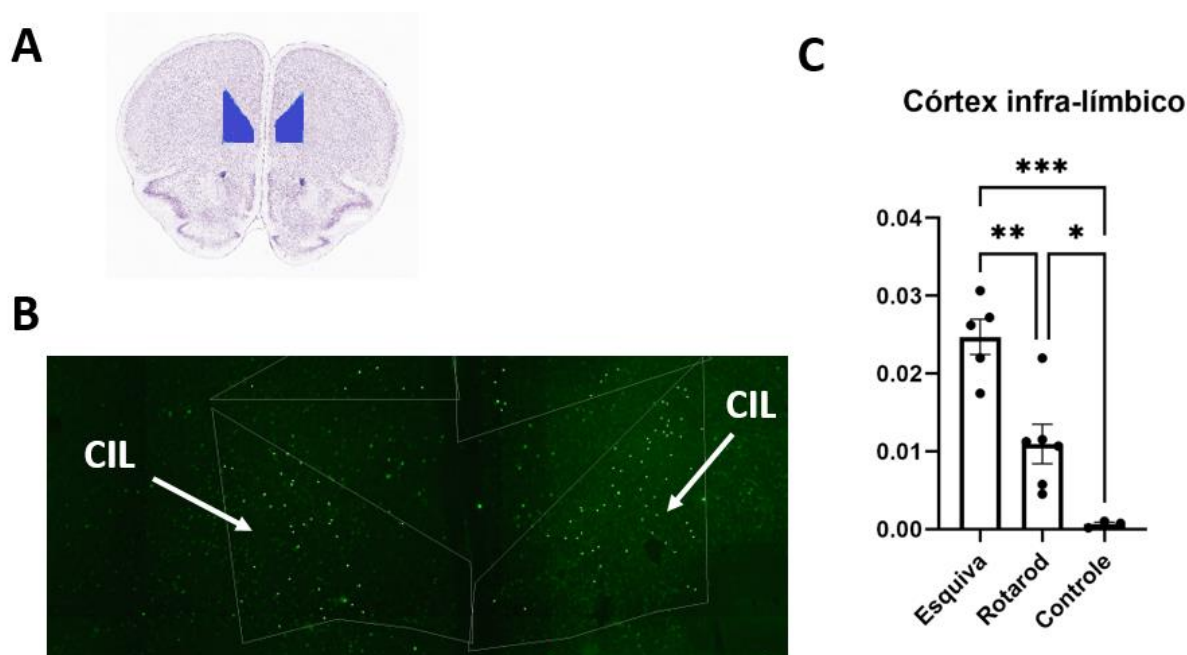


Figura 10. Expressão de c-Fos em córtex infra-límbico (CIL) – Bregma 1.94mm

A- Representação esquemática da estrutura selecionada para análise da expressão de c-Fos. **B-** Figura representativa da imunofluorescência de c-Fos em córtex infra-límbico (CIL). **C-** Gráfico representativo da expressão de c-Fos em córtex infra-límbico nas diferentes condições. As barras representam os valores de média e erro padrão da média da razão c-Fos/dapi. Os pontos indicam a dispersão de valores intra-grupo. * indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$, *** indica $p < 0.001$.

10.5. Hipocampo – Giro denteado

Não foi identificada diferença estatisticamente significativa em giro denteado do hipocampo nos animais expostos à Esquiva Inibitória, RotaRod e animais do grupo controle. ($F_{2,11} = 3.497$; $p = 0.06$), indicando que a exposição dos animais aos aparatos de avaliação não teve expressão significativa de c-Fos, porém houve tendência à diferença $p = 0.06$.

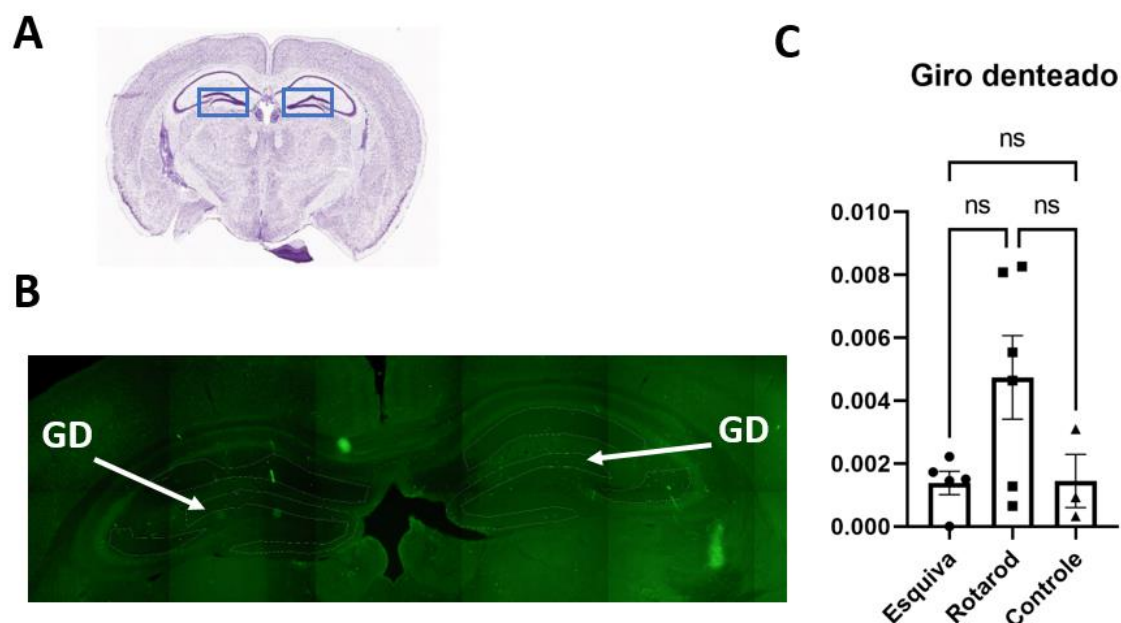


Figura 11. Expressão de c-Fos em giro denteado do hipocampo (GD) – Bregma -2.05mm

A- Representação esquemática da estrutura selecionada para análise da expressão de c-Fos. B- Figura representativa da imunofluorescência de c-Fos no giro denteado (GD). C- Gráfico representativo da expressão de c-Fos no giro denteado. As barras representam os valores de média e erro padrão da média da razão cfos/dapi. Os pontos (Esquiva), quadrados (Rotarod) e triângulos (controle), indicam a dispersão de valores intra-grupo. Ns= não significante.

10.6. Hipocampo – CA1

Foi identificada diferença estatisticamente significativa na expressão de c-Fos em hipocampo (CA1) nos animais que foram expostos ao RotaRod e nos animais expostos à caixa de Esquiva Inibitória ($F_{2,13} = 6.248$; $p = 0.01$). O teste post hoc indicou que os animais do grupo controle tiveram menor expressão de c-Fos quando comparados aos animais que foram expostos ao RotaRod ($p = 0.04$). Em contrapartida, não houve diferença significativa na comparação entre os animais do grupo controle e os animais que foram expostos à caixa de Esquiva Inibitória ($p = 0.98$). Houve diferença significativa na comparação entre os animais que foram expostos à Esquiva Inibitória e ao RotaRod ($p = 0.02$).

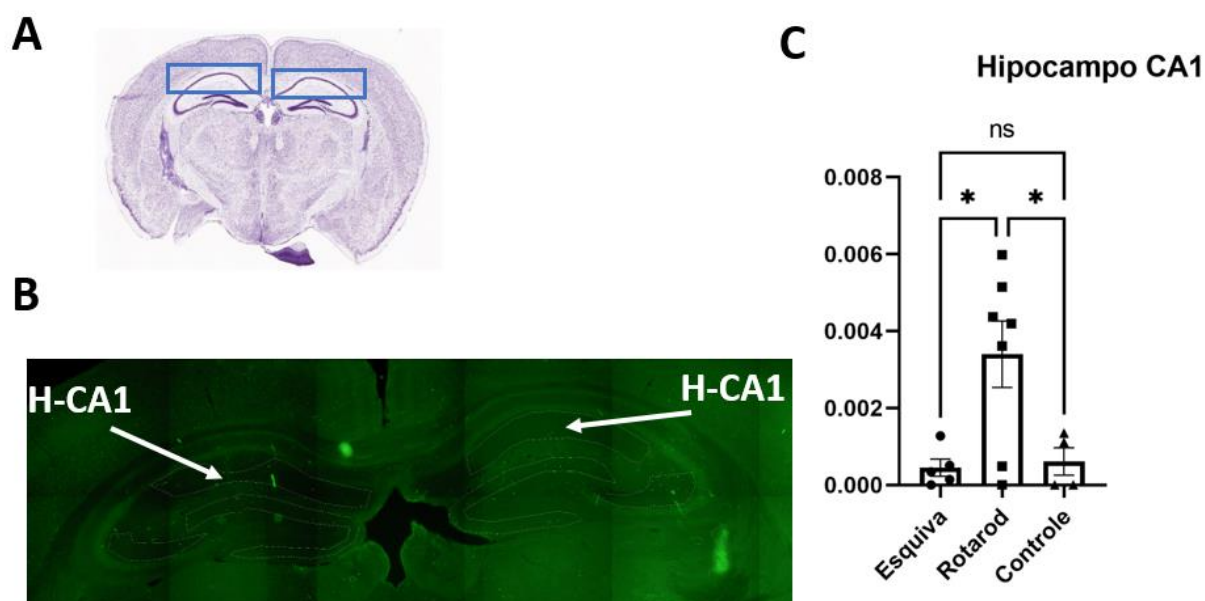


Figura 12. Expressão de c-Fos em área CA1 do hipocampo (H-CA1) – Bregma -2.05mm

A- Representação esquemática da estrutura selecionada para análise da expressão de c-Fos. **B-** Figura representativa da imunofluorescência de c-Fos em área CA1 (H-CA1). **C-** Gráfico representativo da expressão de c-Fos em CA1. As barras representam os valores de média e erro padrão da média da razão cfos/dapi. Os pontos (Esquiva), quadrados (Rotarod) e triângulos (controle), indicam a dispersão de valores intra-grupo. *= $p < 0.05$. Ns= não significante.

10.7. Hipocampo – CA3

Foi identificada diferença estatisticamente significativa na expressão de c-Fos em hipocampo (CA3) nos animais que foram expostos à caixa de Esquiva Inibitória e ao RotaRod. ($F_{2,12} = 6.134$; $p = 0.01$). O teste post hoc de Tukey indicou que não houve diferença significativa na comparação entre os animais do grupo controle e os animais que foram expostos à Esquiva Inibitória ($p = 0.98$) e houve uma tendência à diferença na comparação entre os animais do grupo controle e os animais expostos ao RotaRod ($p = 0.06$). Houve diferença significativa entre os animais expostos à Esquiva Inibitória e os animais expostos ao RotaRod ($p = 0.02$).

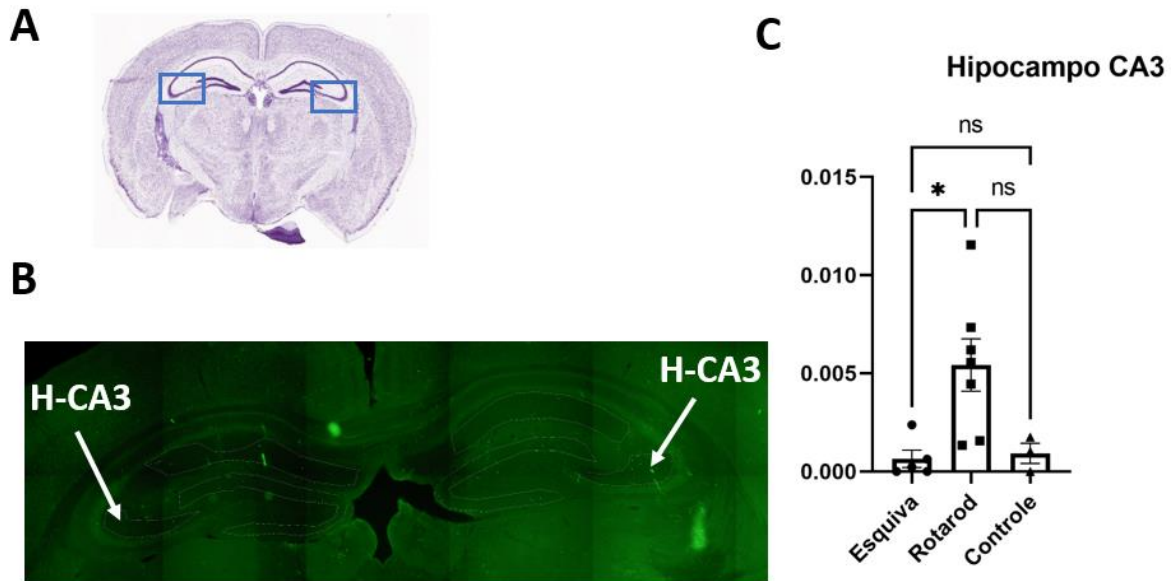


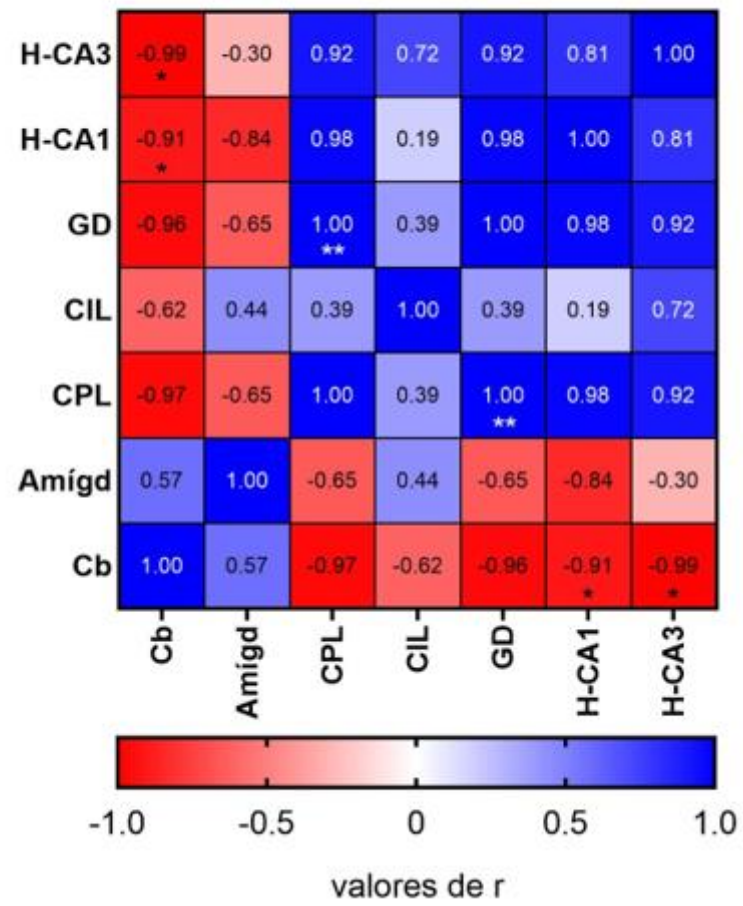
Figura 13. Expressão de c-Fos em área CA3 do hipocampo – Bregma -2.05mm

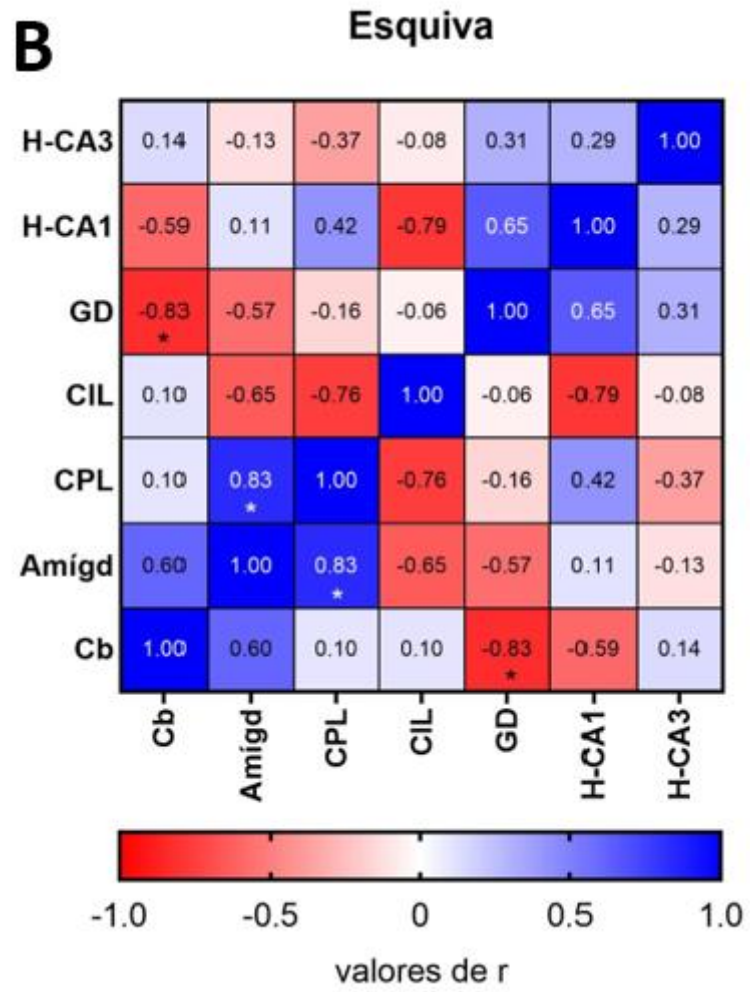
A- Representação esquemática da estrutura selecionada para análise da expressão de c-Fos. **B-** Figura representativa da imunofluorescência de c-Fos em área CA3 (H-CA3). **C-** Gráfico representativo da expressão de c-Fos em CA3. As barras representam os valores de média e erro padrão da média da razão cfos/dapi. Os pontos (Esquiva), quadrados (Rotarod) e triângulos (controle), indicam a dispersão de valores intra-grupo. *= $p < 0.05$. Ns= não significante.

10.8. Coeficiente de Correlação de Pearson r

O teste de Correlação de Pearson r indicou correlação positiva entre giro denteado e área CA3; e uma tendência à correlação positiva entre córtex infra-límbico e córtex pré-límbico na condição RotaRod; uma tendência à correlação positiva entre córtex pré-límbico e amígdala; e uma tendência à correlação negativa entre giro denteado e cerebelo na condição Esquiva Inibitória. (* $p < 0.1$; ** $p < 0.05$) (Figura 14).

A tabela 1 apresenta os valores de média e erro padrão da média da razão células positivas para c-fos/dapi.

A**Controle**



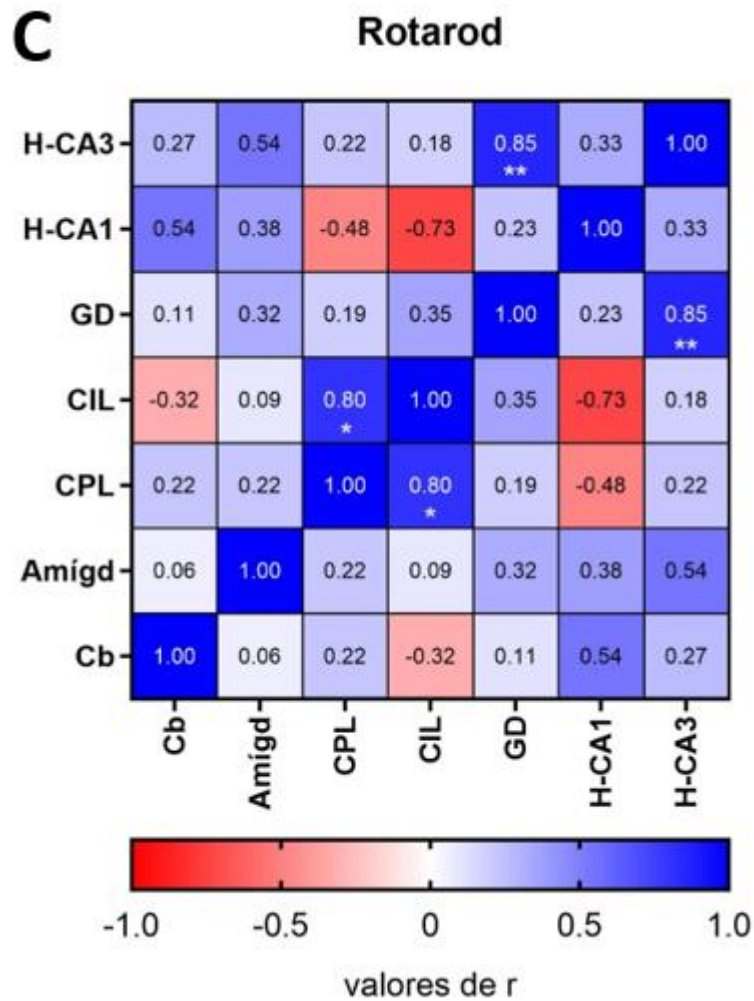


Figura 14. Coeficiente de correlação de Pearson r.

As figuras acima (A: Caixa moradia/Controle; B: Esquiva Inibitória; C: RotaRod) demonstram a análise de correlação inter-regionais para densidade de ativação de c-Fos (Razão cfos/DAPI). Os eixos representam as regiões encefálicas. Um coeficiente de correlação próximo de zero, indica que não há relação entre as variáveis. Quanto mais próximos o coeficiente se aproxima de 1 ou -1, mais forte é a relação entre eles. * $p < 0.1$; ** $p < 0.05$.

Tabela 1. Expressão de cFos/DAPI em diferentes estruturas do sistema nervoso central

	Esquiva Inibitória	RotaRod	Controle
Amígdala	0,010245 ± 0,000473 ↑*	0,011117 ± 0,003054 ↑*	0,00022 ± 0,000149
Cerebelo	0,005147 ± 0,001901	0,008422 ± 0,003222	0,002283 ± 0,00062
Córtex infra-límbico	0,02471 ± 0,002276 ↑***	0,010949 ± 0,002523 ↑*	0,000658 ± 0,000246
Córtex pré-límbico	0,013537 ± 0,00171 ↑**	0,007316 ± 0,001942	0,000777 ± 0,000484
Hipocampo – CA1	0,000454 ± 0,000223	0,003399 ± 0,000864 ↑*	0,000615 ± 0,000358
Hipocampo – CA3	0,00065 ± 0,000448	0,005428 ± 0,00133	0,000929 ± 0,000511
Hipocampo – Giro denteado	0,001382 ± 0,000371	0,004741 ± 0,001328	0,00145 ± 0,000842

Expressão de cFos/DAPI em diferentes estruturas do sistema nervoso central após treinamento de Esquiva

Inibitória, RotaRod e Caixa moradia/Controle. Média ± erro padrão da média; ↑* p<0.05; ↑** p<0.01;

↑*** p<0.001, na expressão de c-Fos em comparação com Controle.

11. DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo são que não houve expressão significativa de c-Fos em lóbulo VI do cerebelo referentes as condições após exposição ao modelo de Esquiva Inibitória e RotaRod. As regiões do hipocampo apresentaram maior expressão de c-Fos nos animais que foram expostos ao RotaRod. A amígdala basolateral apresentou maior expressão de c-Fos tanto nos animais expostos à caixa de Esquiva Inibitória, quanto nos animais expostos ao RotaRod. Tanto córtex pré-límbico, quanto córtex infra-límbico, apresentaram grande expressão de c-Fos nos animais que foram expostos à caixa de Esquiva Inibitória.

Nossos achados referentes à expressão de c-Fos no cerebelo não corroboram com os resultados do estudo de Bureau et al. (2010), que avaliou a aprendizagem motora para estabelecer um mapeamento regional de atividade neural em relação à aprendizagem motora incluindo a aceleração do Rotarod, porém com algumas diferenças metodológicas. Nesse estudo, os autores realizaram testes com os animais por 8 dias. Destes 8 dias, os animais foram expostos ao RotaRod nos dias 1, 2, 3 e 8. Os animais foram sacrificados com 1, 3 e 8 dias de treinamento. Em cada dia de testes, os animais eram colocados no rotador por 10 vezes, tendo 180s de descanso entre as séries. Protocolo este, diferente do nosso, no qual os animais eram expostos ao RotaRod por 2 dias consecutivos, divididos em 3 sessões de 3 exposições e sendo 2 sessões realizadas em um dia, com 4 horas de intervalo entre uma e outra, e 1 sessão realizada no dia seguinte. Ou seja, os animais do estudo de Bureau et al. (2010) receberam mais estímulo em relação aos animais do nosso estudo. Sendo assim, os autores encontraram forte ativação no cerebelo no treino de RotaRod nos animais que foram expostos durante 1, 3 e 8 dias comparados ao grupo que não realizou treino. Com isso, podemos concluir que a expressão de c-Fos no cerebelo se dá através de um grande volume e tempo de exposição à aparatos de avaliação.

Estudos que utilizam o RotaRod puramente para identificar e determinar um mapeamento cerebelar referente à aprendizagem motora são escassos na literatura. Estudos recentes vêm associando a aprendizagem motora através do cerebelo com a adaptação de resposta optocinética. Wada et al. (2014) cita que a resposta optocinética é um movimento ocular intensificado pelo movimento repetido de um campo visual circundante e representa um protótipo de aprendizagem motora dependente do cerebelo. Shutoh et al. (2006) sugeriu que o traço de memória da adaptação de resposta optocinética horizontal é inicialmente codificado no flóculo cerebelar após horas de treinamento

optocinético e transferido para os núcleos vestibulares para ser consolidado na memória motora de longo prazo após dias de treinamento. Okamoto et al. (2011) sugerem que a atividade do córtex cerebelar pós-treinamento diário desempenha um papel importante para a consolidação da memória motora da adaptação de resposta optocinética horizontal. Wada et al. (2014) sugeriram que o cerebelo é o local crítico para aprendizagem motora e a adaptação da resposta optocinética é um protótipo de aprendizagem motora dependente do cerebelo. Em contrapartida, alguns autores acreditam ainda ser controverso o papel do cerebelo nas habilidades motoras. Seidler et al. (2002) sugerem que o conceito do cerebelo como uma máquina de aprendizagem tem sido apoiado por dados que mostram que é essencial para a modificação adaptativa do comportamento reflexo e é ativado durante atividade motora. Entretanto, o aprendizado invariavelmente, leva a mudanças no desempenho motor que por si só geram ativação do cerebelo. Nos estudos até aqui descritos, a amostra foi exposta à determinados estímulos por um tempo maior ao qual nossa amostra foi exposta ao RotaRod. Tal fato pode contribuir para o entendimento de que para o cerebelo expressar sinais de ativação referentes à aprendizagem motora, o mesmo necessita receber grande quantidade de estímulo para promover uma memória de aprendizagem. Outro desafio aparente é conseguir distinguir se uma ativação cerebelar a um estímulo motor se trata de uma resposta ao desempenho motor ou se trata de uma resposta referente à aprendizagem motora.

Até o momento, não encontramos estudos na literatura que aferiram consolidação de memória emocional associado à Esquiva Inibitória através da expressão de c-Fos no cerebelo. Porém, estudos realizados em nosso laboratório para aferir memória emocional através da Esquiva Inibitória, entretanto sem aferir expressão de c-Fos, demonstraram que os animais obtiveram resposta de Esquiva Inibitória após microinjeções de agentes dopaminérgicos (GUILHERME e GIANLORENÇO, 2021) e agentes histaminérgicos (GIANLORENÇO et al. 2013; GIANLORENÇO et al, 2015). Esses resultados abrem caminhos para novas pesquisas sobre a interação dopaminérgica e histaminérgica no cerebelo, além de estudos citohistologicamente detalhados capazes de promover um mapeamento neural cerebelar referentes às funções motoras e não motoras.

Como já descrito, não encontramos uma forte ativação no cerebelo referente à exposição dos animais aos aparatos de avaliação que mensuram a aquisição de funções motoras e não motoras, porém, no estudo de Guell et al. (2018), que utilizaram fMRI em humanos, foi encontrada ativação cerebelar em lóbulos IV, V, VI e VIII na realização de tarefas motoras. Se tratando de tarefas não motoras, foi encontrada ativação em lóbulos

VI, VIIb, IX e X. Já Stoodley et al. (2012), encontraram ativação em lóbulos V, VI e VIII em tarefas motoras e ativação em lóbulos VI e VII em tarefas que exigiam padrões cognitivos engajados.

No estudo de Baumann e Mattingley (2012) foram usadas imagens de ressonância magnética funcional para identificar padrões de atividade neural cerebelar em 30 indivíduos saudáveis, enquanto os mesmos categorizavam imagens que supunha cada uma das cinco emoções primárias: felicidade, raiva, nojo, medo e tristeza. Todas as emoções evocaram padrões de atividades distintos no lobo posterior do cerebelo. As atividades foram mais encontradas predominantemente em vérmis e paravermis cerebelar. Além disso, foram detectadas sobreposições entre as ativações cerebelares para categorias específicas de emoções, o que implica a existência de redes neurais compartilhadas. Apesar de nossos achados não terem demonstrado uma ativação significativa em cerebelo, levando em considerando os achados destes estudos utilizando fMRI, podemos concluir que o cerebelo participa ativamente na realização de funções motoras e não motoras.

Nossos resultados demonstraram que a amígdala basolateral expressou c-Fos consideravelmente quando comparada ao grupo controle, tanto nos animais expostos à caixa de Esquiva Inibitória, quanto nos animais expostos ao RotaRod. O mesmo aconteceu no córtex infra-límbico. Esses resultados sugerem que houve presença de processos emocionais até mesmo na realização da tarefa motora. Estudos sobre as conexões da amígdala com o cerebelo e do córtex infra-límbico com o cerebelo, mensurando memória emocional e aprendizagem motora são escassos na literatura. Em contrapartida, estudos recentes têm demonstrado a relação de atividades de amígdala e córtex infra-límbico, principalmente relacionados à extinção do medo. (BLOODGOOD et al., 2018; LINGAWI et al., 2019; BUKALO et al., 2021).

Encontramos uma tendência à correlação positiva de coeficientes entre córtex pré-límbico e córtex infra-límbico na Condição 3 – RotaRod. Esse achado demonstra sinais de processos emocionais na realização da tarefa motora. Córtex infra-límbico e córtex pré-límbico demonstram interação entre si na modulação do aprendizado. Mukherjee e Caroni (2018) demonstraram que na aprendizagem de medo e extinção de medo, a atividade no córtex pré-límbico é necessária durante uma nova aprendizagem para aplicar associações aprendidas anteriormente, enquanto a atividade no córtex infra-límbico é necessária para aprender associações alternativas às outras. Portanto, essas estruturas possuem papéis específicos e opostos na aprendizagem, para apoiarem juntos uma forma

flexível de nova aprendizagem. Marek e colaboradores (2018) demonstraram que a ativação da conexão entre córtex pré-límbico e córtex infra-límbico aumentam a extinção do medo. A conexão entre córtex pré-límbico e córtex infra-límbico em uma interação de excitação e inibição com a amígdala, modula a expressão do medo (Vidal-Gonzalez et al., 2006). Observando nossos resultados, identificamos forte ativação de córtex pré-límbico e córtex infra-límbico nos animais que foram expostos ao RotaRod. Baseado em nossos resultados, os associando com os resultados dos estudos descritos, podemos concluir que houve um processo de habituação dos animais ao RotaRod frente às repetidas exposições, o que possivelmente, desencadeou uma aprendizagem.

Na correlação de coeficiente de Pearson r na Condição 2 – Esquiva Inibitória, encontramos uma tendência à correlação positiva entre córtex pré-límbico e amígdala. No estudo de Sotres-Bayon et al. (2012) foi demonstrado que o córtex pré-límbico integra informações da amígdala basolateral e que sua inativação diminui a atividade das células de projeção em córtex pré-límbico. Os resultados sugerem que exista um circuito pré-frontal, com participação do hipocampo, no qual o mesmo, bloqueia o medo baseado na amígdala. Em outro estudo, Uematsu et al. (2015) demonstraram ativação por meio de c-Fos e BOLD em córtex pré-límbico e amígdala basolateral, além de conexão estrutural entre as estruturas por meio de tractografia, relacionado à aprendizagem de aversão ao paladar condicionado. A partir de nossos achados, associados com os resultados dos estudos descritos, podemos concluir que córtex pré-límbico e amígdala basolateral possuem forte relação na troca de informações sobre processos emocionais e cognitivos, o que justifica a forte ativação das respectivas estruturas nos animais expostos à caixa de Esquiva Inibitória.

Em nosso estudo, a região hipocampal de CA1 foi a região do hipocampo que mais expressou c-Fos em animais que foram expostos à caixa de Esquiva Inibitória e ainda mais, nos animais que foram expostos ao RotaRod. Dong et al. (2009), sugerem que domínios espaciais do campo CA1 podem ser geneticamente ligados de forma independentes para formar redes funcionais distintas relacionadas à emoção e cognição. Assim como CA1 apresentou maior expressão de c-Fos nos animais expostos ao RotaRod, o mesmo aconteceu com a amígdala, o que sugere que os animais apresentaram sinais de processos emocionais à exposição ao aparato de avaliação que teoricamente, aferiria o desempenho motor e a aprendizagem motora. Já em relação ao campo CA3, de acordo com Gilbert e Kesner (2003), essa região está envolvida na aprendizagem. Segundo Vazdarjanova e Guzowski (2004) o campo CA1 e CA3 desempenham funções

distintas, porém complementares, no processamento de informações espaciais e contextuais. Podemos concluir que os animais apresentaram maior expressão referentes à processos emocionais na exposição ao RotaRod, embora também tenham apresentado expressão referentes à aprendizagem.

Nossos resultados referentes à correlação entre cerebelo e hipocampo, não demonstraram correlação entre as variáveis apresentadas entre as estruturas. Estudos mais clássicos demonstraram correlação entre as estruturas. Newman e Reza (1978) encontraram ativação em ambos hipocampos quando o núcleo fastigial era estimulado. Por outro lado, foi encontrada ativação em lóbulo VI do cerebelo quando o estímulo era dado no hipocampo. Os autores sugeriram a existência de projeções descendentes bilaterais contendo componentes rápidos e lentos em conformidade com as propriedades de condução de fibras musgosas e fibras trepadeiras. Os autores ainda sugeriram que exista diferenças no controle do movimento executado pelo cerebelo em circunstâncias normais e situações de estresse. Outras funções provenientes da conectividade entre cerebelo e hipocampo já foram estudadas. Iglói e colaboradores (2015) utilizaram imagens de fMRI e realidade virtual para examinar a contribuição cerebelar na navegação espacial. Os autores mostraram que existe uma ligação funcional entre cerebelo e hipocampo e identificaram circuitos funcionais específicos que ligam o lóbulo VIIa Crus I do cerebelo aos córtices medial, pré-frontal medial e hipocampal em aspectos não motores de navegação.

Na correlação de coeficientes de Pearson r , encontramos uma tendência à correlação negativa entre giro denteado e cerebelo na Condição 2 – Esquiva Inibitória. Vicario-Abejón e colaboradores (1995) descrevem em seu estudo que células granulares transplantadas para o giro denteado, diferenciam-se em células do tipo giro denteado, sugerindo que compartilham de um repertório semelhante de genes expressos. Em contrapartida, Saito e colaboradores (2001) sugerem que a correlação funcional de giro denteado e cerebelo está mal correlacionada, pois seus achados demonstram que o desenvolvimento de estruturas cerebrais em camadas não possui necessariamente características comuns em seus perfis de expressão gênica. Nossos achados corroboram com estudos presentes na literatura que demonstram ainda ser incerta a correlação entre giro denteado e cerebelo.

Uma correlação positiva de coeficientes encontrada foi entre giro denteado e CA3 na Condição 3 – RotaRod. A função do sistema entre as duas estruturas em um circuito local não é completamente elucidada. O que se sabe é que o sistema entre giro denteado

e CA3 desempenha um papel central na codificação, armazenamento e recuperação de memória (Senzai, 2019). Apesar de ter havido correlação entre os coeficientes, não encontramos expressão de c-Fos significativa das estruturas na comparação entre Condição 3 – RotaRod e Condição 1 – Caixa Moradia/Controle. Sendo assim, concluímos que o tempo e o volume de estímulo ao qual os animais foram expostos, não foram suficientes para desencadear uma expressão de c-Fos significativa referente às funções designadas às estruturas conforme a literatura demonstra.

12. CONCLUSÃO

Concluimos que não houve diferença significativa na expressão c-Fos em lóbulo VI do cerebelo na exposição dos animais aos aparatos de avaliação. Em contrapartida, houve diferença na expressão de c-Fos nas outras estruturas encefálicas pertinentes à processos emocionais na exposição dos animais aos aparatos de avaliação.

13. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugerimos neste estudo que a aprendizagem motora e a memória emocional são volume e tempo-dependentes ao se tratar da participação cerebelar. Comparando nossos resultados com resultados de outros estudos, concluímos que o volume e o tempo de estímulo influenciam diretamente na participação do cerebelo referente à aprendizagem motora e memória emocional.

Segundo ponto a ser destacado é que a análise de estruturas cerebrais engajadas em processamento emocional foi fortemente ativada na realização da tarefa motora. Esses resultados sugerem que de alguma forma, os animais apresentaram sinais de padrão emocional, o que pode ter influenciado de alguma forma no desempenho motor e na aprendizagem motora.

Por fim, sugerimos que estudos mais detalhados em aspectos citohistológicos são necessários para elucidar questões de plasticidade neural cerebelar na realização de tarefas que já existem com importante participação cerebelar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUS J. S.; A theory of cerebellar function; **Mathematical Bioscience**, v. 10, pp. 25-61; 1971.

ALLEN BRAIN ATLAS. LEIN E. S. et al.; Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain; **Nature** **445**: 168-176; doi: 10.1038/nature05453; 2007.

BABAYAN B. M.; WALTILLIAUX A.; VIEJO G.; PARADIS A. L.; GIRARD B.; REIG L. R.; A hippocampo-cerebellar centred network for the learning and execution of sequence-based navigation; **Scientific Reports** **7**; 17812 (2017); doi: 10.1038/s41598-017-18004-7.

BALSTERS J. H.; CUSSANS E.; DIEDRICHSEN J.; PHILLIPS K. A.; PREUSS T. M.; RILLING J. K.; RAMNANI N.; Evolution of the cerebellar cortex: The selective expansion of prefrontal-projecting cerebellar lobules; **NeuroImage**; 49(3): 2045-2052; doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.10.045; 2010.

BAUMANN O.; MATTINGLEY J. B.; Functional topography of primary emotion processing in the human cerebellum; **Neuroimage**; 61(4): 805-811; 2012.

BERGHORN, K. A.; BONNET, J. H.; HOFFMAN G. E.; cfos immunoreactivity is enhanced with biotin amplification; **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**; v. 42, n. 12, p. 1635-1642; doi: 10.1177/42.12.7983364; 1994.

BLOODGOOD D. W.; SUGAM J. A.; HOLMES A.; KASH T. L.; Fear extinction requires infralimbic cortex projections to the basolateral amygdala; **Translational Psychiatry**; 8, 60; doi: 10.1038/s41398-018-0106-x; 2018.

BUGALHO, P. et al.; Papel do Cerebelo nas funções cognitivas e comportamentais: Bases científicas e Modelos de estudo. **Acta Médica Portuguesa**, v. 9, p. 257-268, 2006.

BUKALO O.; NONAKA M.; WEINHOLTZ C. A.; MENDEZ A.; TAYLOR W. W.; HOLMES A.; Effects of optogenetic photoexcitation of infralimbic cortex inputs to the

basolateral amygdala on conditioned fear and extinction; **Behavioral Brain Research**; 396:112913; doi: 10.1016/j.bbr.2020.112913; 2021.

BUREAU G.; CARRIER M.; LEBEL M.; CYR M. Intrastratial inhibition of extracellular signal-regulated kinases impaired the consolidation phase of motor skill learning; **Neurobiology of Learning and Memory**; 94 (2010): 107-115.

CASARTELLI L. et al.; Role of the cerebellum in high stages of motor planning hierarchy; **Journal of Neurophysiology**; 117(4): 1474-1482; doi: 10.1152/jn.00771.2016; Abr/2017.

D'ANGELO E.; CASALI S.; Seeking a unified framework for cerebellar function and dysfunction: from circuit operations to cognition; **Frontiers in Neural Circuits**; v. 6; doi: 10.3389/fncir.2012.00116; 2013.

DAMIANI D. et al.; Aspectos neurofuncionais do cerebelo: o fim de um dogma; **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia**; 35:39-44; doi: 10.1055/s-0035-1570498; 2016.

DA SILVA F. E. F.; O efeito da injeção intracerebroventricular de neuropeptídios na expressão de fos em núcleos dos circuitos de medo em camundongos swiss; Dissertação de Mestrado; Universidade Federal do Rio Grande do Norte; Natal/RN; 2016.

DOMELLÖF E. et al.; Kinematic characteristics of second-order motor planning and performance in 6 and 10 years old children and adults: Effects of age and task constraints; **Developmental Psychobiology**; doi: 10.1002/dev.21911; Jul/2019.

DONG H. W.; SWANSON L. W.; CHEN L.; FANSELOW M. S.; TOGA A. W.; Genomic-anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1; **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; 106(28): 11794-11799; doi: 10.1073/pnas.0812608106; 2009.

ENGELBARDT E.; MOREIRA D. M.; O cerebelo e suas principais conexões: estudo com tensor de difusão; **Revista Brasileira de Neurologia**; 45(3): 17-27; 2009.

ESPERIDIÃO A.V. et al.; Neurobiologia das emoções; **Revista de Psiquiatria Clínica**; 35(2): 55-65; 2008.

EUSTON D. R.; GRUBER A. J.; MC NAUGHTON B. L.; The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making; **Neuron**; 76(6): 1057-1070; doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.002; 20/Dec, 2012.

FARLEY S. J.; RADLEY J. J.; FREEMAN J. H.; Amygdala modulation of cerebellar learning; **The Journal of Neuroscience**; 36(7): 2190-2201; doi: 10.1523/JNEUROSCI.3361-15.2016; 2016.

GAS, C. M. et al.; Cerebellar perineuronal nets in cocaine-induced pavlovian memory: Site matters; **Neuropharmacology**; v. 125, p. 166-180; doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.07.009; Oct/2017.

GIANLORENÇO A. C. L.; CANTO-DE-SOUZA A.; MATTIOLI R.; Intra-cerebelar injection of histamine enhances memory consolidation of inhibitory avoidance learning in mice via H2 receptors; **Neuroscience Letters**; vol. 557, pp. 159-164; doi: 10.1016/j.neulet.2013.10.017; 2013.

GIANLORENÇO A. C. L.; RIVOLDI A. M.; SILVA-MARQUES B.; MATTIOLI R.; Cerebellar vermis H2 receptors mediate fear memory consolidation in mice; **Neuroscience Letters**; vol. 587, pp. 57-61; doi: 10.1016/j.neulet.2014.12.017; 2015.

GILBERT P. E.; KESNER R. P.; Localization of function within the dorsal hippocampus: the role of the CA3 subregion in paired-associate learning; **Behavioral Neuroscience**; 117(6): 1385-1394; doi: 10.1037/0735-7044.117.6.1385; 2003.

GORDON, N. The cerebellum and cognition; **European Journal of Paediatric Neurology**; v. 11, p. 232-234, 2007.

GROSSBERG S.; MERRIL J. W. L.; The hippocampus and cerebellum in adaptively timed learning, recognition, and movement; **Journal of Cognitive Neuroscience**; 8(3): 257-277; doi: 10.1162/jocn.1996.8.3.257; 1996.

GUELL X.; GABRIELI J. D. E.; SCHMAHMANN J. D.; Triple representation of language, working memory, social and emotion processing in the cerebellum: convergent evidence from task and seed-based resting-state fMRI analyses in a single large cohort; **NeuroImage**; v. 172, p. 437-449; 2018.

GUILHERME E. M.; GIANLORENÇO A. C. L.; The effects of intravermis cerebellar microinjections of dopaminergic agents in motor learning and aversive memory acquisition in mice; **Frontiers in Behavioral Neuroscience**; vol. 15, p. 20; doi: 10.3389/fnbeh.2021.628357; 2021.

HASCOET, M.; BOURIN, M.; NIC DHONNCHADHA, B. A.; The mouse light-dark paradigm: a review, **Pro. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**; 25, 141–166, 2001.

HERRERA D. G.; ROBERTSON H. A.; ACTIVATION OF c-fos IN THE BRAIN; **Progress in Neurobiology**; v. 50, pp. 83 to 107; doi: 10.1016/S0301-0082(96)00021-4; 1996.

IGLÓI K.; DOELLER C. F.; PARADIS A. N.; BENCHENANE K.; BERTHOZ A.; BURGEES N.; REIG L. R.; Interaction between hippocampus and cerebellum crus I sequence-based but not place-based navigation; **Cerebral Cortex**; 25(11): 4146-4154; doi: 10.1093/cercor/bhu132; 2015.

JAWORSKI J. et al.; c-Fos and neuronal plasticity: the aftermath of Kacmarek's theory; **Acta Neurobiologia e Experimentalis**; 78:287-296; doi: 10.21307/ane-2018-027; 2018.

JOCA S. R.; PADOVAN C. M.; GUIMARÃES F. S.; Estresse, depressão e hipocampo; **Revista Brasileira de Psiquiatria**; 25(supl II): 46-51; 2003.

KEISER et al.; Sex differences in context fear generalization and recruitment of hippocampus and amygdala during retrieval; **Neuropsychopharmacology**; 42(2): 397-407; doi: 10.1038/npp.2016.174; Jan/2017.

KOZIOL, L. F. et al.; Consensus paper: the cerebellum's role in movement and cognition; **Cerebellum**; 31; doi: 10.1007/s12311-013-0511-x; 2013.

LINGAWI N. W.; LAURENT V.; WESTBROOCK R. F.; HOLMES N. M.; The role of basolateral amygdala and infralimbic cortex in (re)learning extinction; **Psychopharmacology** **236**; 303-312; doi: 10.1007/s00213-018-4957-x; 2019.

MACHADO, A. B. M.; Neuroanatomia Funcional Cerebelo: Anatomia Macroscópica e Divisões; Cap. 6; 2º edição: São Paulo; Editora Atheneu; 2005.

MAREN S.; Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats; **European Journal of Neuroscience**; v. 28, pp. 1661-1666; doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06485.x; 2008.

MAREK R.; XU L. SULLIVAN R. K. P.; SAH P.; Excitatory connections between the prelimbic and infralimbic medial prefrontal cortex show a role for the prelimbic cortex in fear extinction; **Nature Neuroscience** **21**; doi: 654-658; 2018.1; 2018.

MCNAUGHTON N.; CORR P. J.; A two-dimensional neupsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance; **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**; 28(3): 285-305; doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.03.005; May/2004.

MEZZASALMA M. A. et al.; Neuroanatomia do Transtorno de Pânico; **Revista Brasileira de Psiquiatria**; 26(3): 202-6; 2004.

MIDDLETON, F. A.; STRICK, P. L. Cerebellar projections to the prefrontal cortex of the primate; **The Journal of Neurosciences**; v. 5, p. 700-712; doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-02-00700.2001; 2001.

MIDDLETON, F. A.; STRICK, P. L. The cerebellum: an overview; **Trends in Neuroscience**; 21(9): 367-369; doi: 10.1016/S0166-2236(98)01330-7; 1998.

MITERKO, L. N. et al.; Consensus paper: Experimental Neurostimulation of the Cerebellum; **The Cerebellum**; doi: 10.1007/s12311-019-01041-5; Jun/2019.

MORGAN M. A.; ROMANSKI L. M.; LEDOUX J. E.; Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex; **Neuroscience Letters**; 163(1993): 109-113; 1993.

MUKHERJEE A.; CARONI P.; Infralimbic cortex is required for learning alternatives to prelimbic promoted associations through reciprocal connectivity; **Nature Communications** 9; 2727; 2018.

NEWMAN P. P.; REZA H.; Functional relationships between the hippocampus and the cerebellum: a electrophysiological study of the cat; 287(1): 405-426; 1979.

OKAMOTO T.; SHIRAO T.; SHUTOH F.; SUZUKI T.; NAGAO S.; Post-training cerebellar cortical activity plays an importante role for consolidation of memory of cerebellum-dependent motor learning; **Neuroscience Letters**; 504(1):53-56; 2011.

POPA L. S.; HEWITT A. L.; EBNER T. J.; The cerebellum for jocks and nerds alike; **Frontiers in system neurosciences**; 8:113, doi: 10.3389/fnsys.2014.00113; 17 jun 2014.

PRADO P. T. C.; DEL BEL E. A.; c-fos, UM GENE DE ATIVAÇÃO IMEDIATA COMO MARCADOR NEURAL DE NOCICEPÇÃO; **Medicina** (Ribeirão Preto. Online); v. 31, n. 3, p. 424-433; doi: 10.11606/issn.2176-7262.v31i3p424-433; set/1998.

SAITO S.; MATOBA R.; UENO N.; MATSUBARA K.; KATO K.; Comparison of gene expression profiling during postnatal development of mouse dentate gyrus and cerebellum; **Physiological Genomics**; 8: 131-137; doi: 10.1152/physiolgenomics.00077.2001; 2001.

SACCHETTI B.; SACCO T.; STRATA P.; Reversible inactivation of amygdala and cerebellum but not perirhinal cortex impairs reactivated fear memories; vol. 25, pp. 2875-2884; doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05508.x; 2007.

SEIDLER R. D.; PURUSHOTHAM A.; KIM S.G.; Ugurbil K.; Willingham D.; Ashe J.; Cerebellum activation associated with performance change but not motor learning; **Science**; 296(5575): 2043-2046; 2002.

SENZAI Y.; Function of local circuits in the hippocampal dentate gyrus-CA3 system; **Neuroscience Research**; 140: 43-52; doi: 10.1016/j.neures.2018.11.003; 2019.

SCHMAHMANN, J. D.; PANDYA D. N.; Prefrontal cortex projections to the basilar pons in rhesus monkey: implications for the cerebellar contribution to higher function; **Neuroscience Letters**, 199(3): 175-178; doi: 10.1016/0304-3940(95)12056-A; 1995.

SCHMAHMANN, J. D.; WEILBURG, J. B.; SHERMAN, J. C.; The neuropsychiatry of the cerebellum – insights from the clinic; **The cerebellum**; v. 6, p. 254-267; doi: 10.1080/14734220701490995; 2007.

SHIN L. M.; RAUCH S. L.; PITMAN R. K.; Amygdala, Medial pre frontal cortex, and Hippocampal Function in PTSD; **Annals New York Academy of Science**; 1071: 67-79; doi: 10.1196/annals.1364.007; 2006.

SHUTOH F.; OHKI M.; KITAZAWA H.; ITOHARA S.; NAGAO S.; Memory trace of motor learning shifts transsynaptically from cerebellar cortex to nuclei for consolidation; **Neuroscience**; 139(2):767-777; 2006.

SOTRES-BAYON F.; SIERRA-MERCADO D.; PARDILLA-DELGADO E.; QUIRK G. J.; Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs; **Neuron**; 76(4): 804-812; 2012.

STOODLEY C. J.; VALERA E. M.; SCHMAHMANN J.D; Functional topography of the cerebellum for motor and cognitive tasks: An fMRI study; **NeuroImage**; 59(2):1560-1570; 2012.

TAVANO, A. BORGATTI, R.; Evidence for a link among cognition, language and emotion in cerebellar malformations; **Cortex**; v. 46, p. 907-918; doi: 10.1016/j.cortex.2009.07.017; 2010.

TRONEL S.; SARA S. J.; Mapping of olfactory memory circuits: region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval; **Learning & Memory**; 9:105-111; 2002.

TURNER B. M. et al.; The cerebellum and emotional experience; **Neuropsychology**; v. 45(6): 1331-1341; doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2006.09.023; 2007.

UEMATSU A.; KITAMURA A.; IWATSUKI K.; UNEYAMA H.; TSURUGISAWA T.; Correlation between activation of the prelimbic cortex, basolateral amygdala, and agranular insular cortex during taste memory formation; **Cerebral Cortex**; 25(9): 2719-2728; 2015.

VAZDARJANOVA A.; GUZOWSKI J. F.; Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidence of distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles; **Journal of Neurosciences**; 24(29): 6489-6496; doi: 10.1523/JNEUROSCI.0350-04.2004; 2004.

VICARIO-ABEJÓN C.; CUNNINGHAM M. G.; MCKAY R. D. G.; Cerebellar precursors transplanted to the neuronal dentate gyrus express features characteristics of hippocampal neurons; **Journal of Neuroscience**; 75: 6351-6363; 1995.

VIDAL-GONZALEZ I.; VIDAL-GONZALEZ B.; RAUCH S. L.; QUIRK G. J.; Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear; **Learning Memory**; 13: 728-733; doi: 10.1101/lm.306106; 2006.

WADA N.; FUNABIKI K.; NAKANISHI S.; Role of granule-cell transmission in memory trace of cerebellum-dependent optokinetic motor learning; **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; 111(14):5373-5378; 2014.

WANG B. et al.; New learning and memory related pathways among the hippocampus, the amygdala and the ventromedial region of the striatum in rats; **Journal of Chemical Neuroanatomy**; 71:13-19; doi: 10.1016/j.jchemneu.2015.12.006; 2016.

WATSON T. C.; BECKER N.; APPS R.; JONES M. W.; Back to front: cerebellar connections and interactions with the prefrontal cortex; **Frontiers in Systems Neuroscience**; doi: 10.3389/fnsys.2014.00004; 2014.

WITTER L.; DE ZEEUW C. I.; Regional functionality of the cerebellum; **Current Opinion in Neurobiology**; vol. 33, pp. 150-155; doi: 10.1016/j.conb.2015.03.017; 2015.

XAVIER S.; FERREIRA B.; Aspectos neuropsiquiátricos do cerebelo; **Revista do Serviço de Psiquiatria do Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca**; v. 10, n. 1, pp.: 34-42; Junho/2012.

LISTA DE ANEXOS

Pró Reitoria
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Ativação neuronal de circuitos funcionais do cerebelo nas funções motoras e não motoras em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 2401120819 (ID 001336), sob a responsabilidade de **José Mário Prati e equipe; Anna Carolyn Lepesteur Gianlorenço** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 22/10/2019.

We certify that the proposal "Neuronal activation of cerebellum functional circuits in motor and non-motor functions in mice", utilizing 90 Heterogenics mice (90 males), protocol number CEUA 2401120819 (ID 001336), under the responsibility of **José Mário Prati and team; Anna Carolyn Lepesteur Gianlorenço** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 10/22/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2019** a **06/2020** Área: **Fisioterapia**

Origem: **Biotério Central da UFSCar**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **10 a 15 dias**

N: **90**

Linhagem: **Suíço Albino**

Peso: **25 a 35 g**

Local do experimento: Os procedimentos serão realizados em uma sala de experimentação do Laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia.

São Carlos, 14 de abril de 2021

Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

