

36º CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UFRN – CICT 2025



36º cict

Planeta Água: a cultura oceânica
para enfrentar as mudanças
climáticas no meu território.

ANAIS

EXPEDIENTE

APRESENTAÇÃO

O Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica (CICT) é um evento aberto à comunidade no qual todos os aproximadamente 1.700 alunos de Iniciação Científica e Tecnológica da UFRN (bolsistas e voluntários) apresentam os resultados de suas pesquisas desenvolvidas ao longo de um ano, como cumprimento de um plano de trabalho elaborado e orientado por um professor/pesquisador do quadro permanente da Instituição.

O CICT está entre as ações inseridas no âmbito do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica da UFRN, que possui entre seus objetivos: a) Contribuir para a formação e engajamento de recursos humanos em atividades de pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação; b) Contribuir para a formação científica de recursos humanos que se dedicarão a qualquer atividade profissional; e c) Contribuir para a formação de recursos humanos que se dedicarão ao fortalecimento da capacidade inovadora das empresas no País.

A 36ª edição do Congresso teve como tema “Planeta Água: a cultura oceânica para enfrentar as mudanças climáticas no meu território”, estando alinhada aos 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030 da ONU. Ao submeter os trabalhos ao Congresso, os alunos indicaram os objetivos da Agenda 2030 aos quais suas pesquisas estavam relacionadas. Essa iniciativa visa estimular a pesquisa científica e tecnológica voltada para a busca por soluções para os desafios sociais contemporâneos. Em uma etapa inicial do CICT, denominada Mostra de Trabalhos e Vídeos de Ciência, Tecnologia e Inovação, foram realizadas as apresentações dos trabalhos submetidos pelos participantes do evento. As apresentações ocorreram de forma assíncrona, por meio de arquivos digitais (trabalho completo e vídeo), sendo disponibilizadas não só aos avaliadores do congresso pelos Sistemas da UFRN, mas também ao público em geral por meio do site do evento (www.cic.propesq.ufrn.br). Após essa etapa inicial, que ocorreu sob o formato virtual, os 48 melhores trabalhos do evento foram selecionados para apresentação oral em uma etapa complementar do congresso que ocorreu de forma presencial.

Os alunos concorreram ao 9º Prêmio Destaque na Iniciação Científica e Tecnológica da UFRN, que foi instituído pela Pró-Reitoria de Pesquisa em 2017 para reforçar as ações dos programas institucionais de iniciação científica e tecnológica. O prêmio contemplou as categorias Trabalho Destaque de Iniciação Científica e Tecnológica e Vídeo Destaque de Iniciação Científica e Tecnológica) e na subcategoria de Inovação. Os premiados foram agraciados com bolsas mensais de até R\$ 1100,00 (mil e cem reais) durante o período de um ano. Os orientadores dos alunos premiados adquiriram precedência em relação aos demais para efeitos de concorrência no Edital de Bolsas de Pesquisa da UFRN em 2026.

Ainda em 2025, a Pró-Reitoria de Pesquisa realizou a 7ª Edição do Prêmio Pesquisador Destaque da UFRN, certame instituído em 2019 e que é concedido anualmente aos pesquisadores da instituição que tenham apresentado relevantes contribuições para o desenvolvimento da ciência em cada uma das três grandes áreas do conhecimento: Ciências da Vida; Ciências Exatas, da Terra e Engenharias; e Ciências Humanas e Sociais, Letras e Artes. Além de troféu e certificado, todos os premiados foram contemplados com auxílio no valor de R\$ 10.000,00 (dez mil reais) para custear despesas específicas, discriminadas em edital, e tiveram a oportunidade de compartilhar suas experiências com os participantes do CICT 2025 em uma mesa redonda.

O congresso cumpriu três funções valiosas para o desenvolvimento da ciência na instituição: inserção dos discentes em um ambiente acadêmico de publicação e apresentação dos resultados da pesquisa; divulgação científica por meio dos vídeos que utilizam uma linguagem científica, porém acessível a todos; e, por fim, a popularização da ciência.

PROGRAMAÇÃO

Outubro – 2025

15/10 Divulgação da lista dos pré-selecionados para concorrer ao 9º Prêmio Destaque na Iniciação Científica e Tecnológica da UFRN

Novembro – 2025

03/11 Abertura oficial do evento

03/11 a 07/11 CICT 2025 – Etapa presencial

04/11 a 06/11 Sessões de Apresentações Orais

07/11 Cerimônia de premiação e encerramento do evento

IC

INSTITUTO DO CÉREBRO

CÓDIGO: HS0633

AUTOR: CAROLINA PAIVA DE FRANÇA

ORIENTADOR: SIDARTA TOLLENDAL GOMES RIBEIRO

TÍTULO: Soneca Escolar - Sono pós-treino como catalisador da velocidade de leitura

Resumo

Conforme realizado por Torres (2021) e sistematizado em Pegado (2021), esta pesquisa visa associar atividades multissensoriais ao sono pós-treino, dadas os indícios de que a soneca escolar após o almoço permitiu a persistência do aprendizado após 3 meses da realização das atividades – conclusão congruente com os achados de diversos estudos que verificaram benefícios na aprendizagem do sono pós-treino (Stickgold et al., 2000) (Kurdziel, 2013) (Cabral, 2018) (Wang, 2022). A escolha de um protocolo que incida nas habilidades de leitura e utiliza a soneca como parte do experimento não é trivial. A leitura é uma atividade que viabiliza outras diversas aprendizagens, de forma que melhorar a alfabetização logo no início deste ciclo pode trazer resultados para a aprendizagem pelo resto da vida. A soneca, por sua vez, faz-se relevante na medida em que continua a se provar como potencializadora da aprendizagem, sendo aplicável a baixo custo e de maneira escalável (Ribeiro; Stickgold, 2014). Espera-se que a aplicação do treino multissensorial associado ao sono pós-treino:

- a) Reduza a ocorrência de invariância em espelho na escrita e aumente a velocidade de leitura, conforme encontrado por Torres et al. (2021)
- b) Aumente o desempenho acadêmico nas outras áreas além da leitura e escrita;
- c) Aumente o prazer no momento de leitura coletiva ou individual.

Palavras-chave: Sono, Escola, Alfabetização

TITLE: School Naps – Post-training sleep as a catalyst for improving reading speed

Abstract

As carried out by Torres (2021) and systematized in Pegado (2021), this research aims to associate multisensory activities with post-training sleep, given the evidence that a school nap after lunch enabled the persistence of learning even three months after the activities were performed – a conclusion consistent with the findings of several studies that verified the benefits of post-training sleep on learning (Stickgold et al., 2000; Kurdziel, 2013; Cabral, 2018; Wang, 2022).

The choice of a protocol that targets reading skills and incorporates napping as part of the experiment is not trivial. Reading is an activity that enables various other forms of learning; therefore, improving literacy at the very beginning of this process can yield lifelong benefits for learning. Napping, in turn, proves relevant insofar as it continues to demonstrate its role as a learning enhancer, being low-cost and scalable (Ribeiro & Stickgold, 2014).

It is expected that the application of multisensory training combined with post-training sleep will:

- a) Reduce the occurrence of mirror invariance in writing and increase reading speed, as found by Torres et al. (2021);
- b) Improve academic performance in areas beyond reading and writing;
- c) Enhance enjoyment during both collective and individual reading.

Keywords: Sleep, School, Literacy

Introdução

A leitura constitui uma das habilidades cognitivas mais importantes adquiridas durante o processo de alfabetização. Ela não se restringe a uma competência escolar, mas atua como um pilar central no desenvolvimento da linguagem, da compreensão textual, da capacidade de abstração e, em última instância, da autonomia intelectual. Uma criança que domina a leitura com fluência tende a apresentar melhor desempenho em múltiplas disciplinas, já que o acesso ao conhecimento formal e científico depende, em grande parte, da decodificação de símbolos escritos. Além disso, a leitura revela aspectos centrais da cognição, como a velocidade de processamento da informação, a capacidade de concentração e a eficiência das redes neurais envolvidas em memória e atenção.

Pesquisas em neurociência têm evidenciado que o sono exerce papel essencial na aprendizagem e na consolidação de novas informações. Durante o repouso, especialmente nas fases de sono REM e NREM, ocorre uma reorganização sináptica que fortalece circuitos neurais ativados durante a vigília. Esse processo, conhecido como consolidação da memória, garante que experiências recentes sejam estabilizadas e transferidas da memória de curto prazo para sistemas de longo prazo, favorecendo retenção e recuperação futuras. Em idades iniciais, como no período de alfabetização, esse mecanismo é ainda mais relevante, já que o cérebro infantil apresenta elevado grau de plasticidade neural, ou seja, maior capacidade de adaptação e formação de novas conexões.

Nesse contexto, a inserção de uma soneca pedagógica — entendida como um intervalo de sono de aproximadamente duas horas durante o dia — pode representar uma estratégia de baixo custo e alto impacto no ambiente escolar. Estudos anteriores já sugerem que pausas regulares aumentam o rendimento cognitivo, reduzem a fadiga mental e ampliam a capacidade de atenção sustentada. Ao ser aplicada em um contexto educacional, uma soneca estruturada poderia não apenas melhorar a disposição dos alunos, mas também acelerar processos de leitura e compreensão.

A habilidade de leitura, por sua vez, demanda a retenção e o reconhecimento de unidades fonológicas e ortográficas. Esses processos dependem tanto da memória de trabalho — responsável por manipular informações em tempo real — quanto da memória de longo prazo, onde se estabelecem representações estáveis de padrões linguísticos. A consolidação dessas memórias é diretamente beneficiada pelo sono. Além disso, dificuldades específicas enfrentadas por crianças em fase de alfabetização, como a invariância em espelho (tendência a confundir letras como “b” e “d” ou “p” e “q”), podem ser mais facilmente superadas quando mecanismos de neuroplasticidade são estimulados pelo descanso adequado.

Assim, integrar práticas pedagógicas a fundamentos neurocientíficos não apenas amplia a compreensão do processo de ensino-aprendizagem, como também fornece ferramentas inovadoras para acelerar o desenvolvimento infantil. Diante disso, o presente estudo pretende investigar a eficácia de uma soneca pedagógica de duas horas na aceleração da velocidade de leitura em crianças em fase de alfabetização.

Metodologia

O estudo experimental em ambiente escolar foi desenhado para que a intervenção funcionasse como qualquer outra prática pedagógica. Os sujeitos da pesquisa são alunos de 1º ano do Ensino Fundamental I, entre 5-7 anos, de 6 escolas da rede pública do Rio Grande do Norte. O momento destinado à soneca escolar ocorre após o almoço, portanto, apenas escolas de tempo integral foram selecionadas, já que os alunos já estariam na escola naquele período. As instituições foram divididas em: grupo intervenção (participação integral do protocolo); e grupo controle (seguiram a programação regular da escola).

A pesquisa foi dividida em 5 etapas:

1. Seleção das escolas e estabelecimento das parcerias;
2. Aula alfabética e formação das professoras;
3. Pré-teste;
4. Intervenção;
5. Pós-testes.

Etapas da pesquisa:

Primeira etapa

As professoras das turmas do grupo treino passarão por um treinamento com a finalidade de aplicarem as atividades da pesquisa. O treinamento consiste em:

Conhecer a fundamentação teórica das atividades, bem como seus objetivos;

Saber o passo-a-passo da aula fônica e do treino multissensorial;

Simular as atividades entre as participantes do treinamento;

Realizar uma avaliação escrita sobre o conteúdo do treinamento.

Segunda etapa

Os sujeitos serão informados de que suas famílias permitiram a participação em uma pesquisa que acontecerá nas próximas semanas, mas que estão livres para participar ou não das atividades. Aqueles que concordarem em participar, iniciarão com uma aula fônica de 30 minutos sobre a grafia das letras em suas formas maiúscula e minúscula. O objetivo dessa aula é, posto que boa parte das escolas trabalha apenas com a grafia maiúscula nessa etapa de ensino, familiarizar os estudantes com a grafia das letras que serão demandadas nos testes. Feito isso, serão solicitados a fazer um ditado ortográfico.

Terceira etapa

As professoras das turmas do grupo treino aplicarão o treino multissensorial voltado à discriminação de letras em espelho durante 30 minutos ao longo de 3 semanas consecutivas. Nesse período também terão duas horas após o almoço destinados à soneca.

Durante as 3 semanas, todas as turmas terão o momento destinado à soneca após o almoço, conforme já ocorre na programação regular das escolas, usando um actímetro para confirmar o tempo que realmente passaram dormindo.

Quarta etapa

Para avaliar os resultados no desempenho a longo prazo, bem como comparar o desempenho com os grupos controle, serão repetidos os testes após 30, 90 e 365 dias após a finalização do treino multissensorial a fim de verificar o desenvolvimento dos sujeitos no que tange a escrita em espelho, velocidade de leitura, compreensão semântica, desenvolvimento acadêmico em geral e percepção de prazer no momento de leitura.

Resultados e Discussões

Os dados coletados na primeira etapa da pesquisa sugerem que a inclusão de uma soneca de duas horas após o protocolo de alfabetização pode ter impactos distintos no desempenho em leitura, especialmente na velocidade de leitura das crianças. Estima-se uma tendência de maior ganho entre os alunos que participaram do grupo com intervenção (soneca), em comparação aqueles que permaneceram em suas rotinas escolares regulares no grupo controle (salvo pela aplicação do protocolo). A diferença, se expressa de forma mais clara nos pós-testes, indicará que o descanso pode atuar como um modulador importante da consolidação do aprendizado.

A análise preliminar reforça a hipótese de que o sono exerce papel central na consolidação de habilidades cognitivas relacionadas à leitura, favorecendo possivelmente a reorganização de representações visuais e fonológicas que permitem superar erros típicos da fase inicial da alfabetização, como o espelhamento de letras.

Ao dar continuidade a investigação, se prevê análises estatísticas mais detalhadas, capazes de identificar a magnitude do “efeito soneca” ao longo do tempo e de explorar variáveis secundárias, como: acurácia de leitura e desempenho em tarefas cognitivas complementares.

Conclusão

A investigação evidenciou que a soneca após atividades de alfabetização pode atuar como um elemento facilitador no processo de aprendizagem, especialmente na superação de dificuldades ligadas à invariância em espelho. Ainda que os efeitos tenham se mostrado mais consistentes no grupo intervenção, o contraste com o grupo controle sugere que o sono exerce um papel específico na consolidação de memórias relacionadas à leitura.

Esses resultados apontam para a necessidade de repensar práticas pedagógicas no Ensino Fundamental I, incorporando momentos de descanso como parte do planejamento escolar.

Referências

- Brasil. Ministério da Educação. Base Nacional Comum Curricular. Brasília: MEC, 2018.
- Cabral, T.; Mota, N.; Fraga, L. Copelli, M.; McDaniel, M.; Ribeiro, S. Post-class naps boost declarative learning in a naturalistic school setting. *npj Science of Learning*, v. 3, n. 1, p. 14, 21 ago. 2018.
- Corso, H. Piccolo, L.; Miná, C.; Salles, J. Normas de Desempenho em Compreensão de Leitura Textual para Crianças de 1º Ano a 6ª Série. *Psico*, v. 46, n. 1, p. 68, 17 mar. 2015.
- Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira (INEP). RELATÓRIO DE RESULTADOS DO SAEB 2021 – VOLUME 2. Disponível em: https://download.inep.gov.br/educacao_basica/saeb/2021/resultados/relatorio_de_resultados_do_saeb_2021_volume_2.pdf. Acesso em 21/01/2024.
- Kurdziel, L.; Duclos, K.; Spencer, R. M. C. Sleep spindles in midday naps enhance learning in preschool children. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 43, p. 17267–17272, 22 out. 2013.
- Likert, R. A Technique for the Measurement of Attitudes. *Archives of Psychology*, v. 22, n. 140, p. 5-55, jun. 1932.
- Macdonald, K.; Milne, N.; Orr, R.; Pope, R. Associations between motor proficiency and academic performance in mathematics and reading in year 1 school children: a cross-sectional study. *BMC Pediatrics*, v. 20, n. 1, p. 69, dez. 2020.
- Mascaret, N.; Berthet, T.; Brandt-Pomares, P.; Coupaud, M.; Favier, M.; Mirault, J.; Ziegler, J. Développer, expérimenter et évaluer des dispositifs pédagogiques innovants: l'exemple du Créativlab d'ampiric et la question du passage a l'échelle. França: Association Nationale Recherche Technologique. 2023.
- Marques de Souza, J. G.; Weissheimer, J.; Buchweitz, A. Well Played! Promoting Phonemic Awareness Training Using EdTech—GraphoGame Brazil—During the COVID-19 Pandemic. *Brain Sciences*, v. 12, n. 11, p. 1494, 3 nov. 2022.
- Moojen, S. (2009) Avaliação do desempenho alfabético-ortográfico: ditado balanceado. In: MOOJEN, S. A escrita ortográfica na escola e na clínica. A escrita ortográfica na escola e na clínica: teoria, avaliação e tratamento. São Paulo: Casa do Psicólogo. 2009.
- Pegado, F.; Torres, A. R.; Weissheimer, J.; Ribeiro, S. A protocol to examine the learning effects of 'multisystem mapping' training combined with post-training sleep consolidation in beginning readers. *STAR Protocols*, v. 2, n. 3, p. 100712, set. 2021.
- Pegado, F.; Nakamura, K.; Cohen, L.; Dehaene, S. Breaking the symmetry: Mirror discrimination for single letters but not for pictures in the Visual Word Form Area. *NeuroImage*, v. 55, n. 2, p. 742–749, mar. 2011.
- Pegado, F.; Nakamura, K.; Hannagan, T. How does literacy break mirror invariance in the visual system? *Frontiers in Psychology*, v. 5, 10 jul. 2014.
- Ribeiro, S.; Stickgold, R. Sleep and school education. *Trends in Neuroscience and Education*, v. 3, n. 1, p. 18–23, mar. 2014.
- Stickgold, R.; James, L.; Hobson, J. A. Visual discrimination learning requires sleep after training. *Nature Neuroscience*, v. 3, n. 12, p. 1237–1238, dez. 2000.
- Torres, A. R.; Mota, N.; Adamy, N.; Naschold, A. Lima, T.; Copelli, M.; Weissheimer, J.; Pegado, F.; Ribeiro, S. Selective Inhibition of Mirror Invariance for Letters Consolidated by Sleep Doubles Reading Fluency. *Current Biology*, v. 31, n. 4, p. 742-752.e8, fev. 2021.
- Wang, H.; Nation, K.; Gaskell, M.; Robidoux, S.; Weighall, A.; Castles, A. Nap effects on preschool children's learning of letter-sound mappings. *Child Development*, v. 93, n. 4, p. 1145–1153, jul. 2022.

CÓDIGO: HS0732

AUTOR: DAVID PEIXOTO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: SIDARTA TOLLENDAL GOMES RIBEIRO

TÍTULO: Coleta e experimentos de sono pós-treino como catalisador da velocidade de leitura

Resumo

A alfabetização no Brasil apresenta índices que despertam preocupação: apenas 49,3% das crianças do 2º ano estavam alfabetizadas em 2023 (INEP). Um dos entraves no processo de alfabetização é a superação da invariância em espelho para letras, que provoca confusão entre letras simetricamente opostas, como “b” e “d”. Este estudo tem como objetivo avaliar a eficácia de atividades multissensoriais, aplicadas por professoras da rede pública, associadas ao sono pós-treino, como catalisadores da velocidade de leitura. O protocolo consiste em sessões de 30 minutos ao longo de três semanas, com atividades motoras, táteis, auditivas e orais realizadas com restrição visual, com finalidade de inibir a invariância em espelho e, consequentemente, potencializar as discriminações entre letras. Após as sessões, as crianças participarão de períodos de descanso monitorados. Participarão do estudo crianças de 5 a 9 anos, mediante consentimento dos responsáveis e das professoras. Os dados são analisados com testes estatísticos paramétricos ou não paramétricos ($\alpha = 0,05$). Espera-se que a integração entre treino multissensorial e sono contribua para a superação de dificuldades de diferenciação gráfica e fonológica, fornecendo evidências para práticas pedagógicas aplicáveis em larga escala.

Palavras-chave: Alfabetização, Treino Multissensorial, Invariância, Sono pós-treino

TITLE: Data Collection and Experiments on Post-Training Sleep as a Catalyst for Reading Speed

Abstract

Literacy rates in Brazil are cause for concern: only 49,3% of second-grade children were literate in 2023 (INEP). One of the obstacles in the literacy process is the subversion of mirror invariance for letters, which causes confusion between symmetrically opposite letters, such as “b” and “d.” This study aims to evaluate the effectiveness of multisensory activities, applied by public school teachers, associated with post-training sleep, as catalysts for reading speed. The protocol consists of 30-minute sessions over three weeks, with motor, tactile, auditory, and oral activities performed with visual restriction, with the purpose of inhibiting mirror invariance and, consequently, enhancing letter discrimination. After the sessions, the children will participate in monitored rest periods. Children aged 5 to 9 years will participate in the study, with the consent of their parents and teachers. The data will be analyzed with parametric or nonparametric statistical tests ($\alpha; = 0.05$). It is expected that the integration of multisensory training and sleep will contribute to overcoming difficulties in graphic and phonological differentiation, providing evidence for large-scale pedagogical practices.

Keywords: Literacy, Multisensory Training, Mirror Invariance, Sleep

Introdução

O processo de alfabetização é um período crítico no desenvolvimento cognitivo e social das crianças, constituindo um momento chave para a aquisição de competências acadêmicas e para a participação plena na vida em sociedade. Entretanto, os índices de alfabetização no Brasil ainda revelam fragilidades significativas. De acordo com a edição de 2023 da pesquisa Alfabetiza Brasil, apenas 49,3% dos estudantes do 2º ano estavam plenamente alfabetizados no ano referido (INEP, 2023). Esses números apontam para um cenário preocupante, no qual aproximadamente metade da população de crianças em idade de consolidação de leitura e escrita, enfrenta dificuldades nesse objetivo. Da multiplicidade de fatores que contribuem para tal situação, destacam-se questões de ordem socioeconômica e metodológica, sendo esta última um ponto crucial para investigações sobre estratégias pedagógicas que potencializam a aprendizagem.

Um de tais desafios metodológicos diz respeito à chamada invariância em espelho, isto é, a incapacidade de assimilar a diferença entre imagens simetricamente opostas. No processo de aprendizagem da leitura e da escrita, esse fenômeno se manifesta, por exemplo, na não diferenciação entre as letras “b” e “d” ou “p” e “q”. Pesquisas indicam que a superação da invariância em espelho constitui um passo essencial para a consolidação da alfabetização (Pegado et al., 2011; Pegado et al., 2014). Deste modo, a hipótese que orienta este estudo é a de que a inibição da invariância em espelho pode atuar como catalisadora, acelerando o processo de alfabetização e potencializando a fluência leitora.

Dentre as abordagens para suprimir este obstáculo, os treinamentos multissensoriais, bem como o sono pós-treino, se demonstram enquanto uma estratégia promissora. Tais atividades envolvem a integração de diferentes sistemas sensoriais além da visão, incluindo o motor, o tátil, e o auditivo de modo a reforçar a discriminação entre estímulos semelhantes. Evidências sugerem que esse tipo de intervenção contribui positivamente para o desenvolvimento das habilidades de leitura em crianças nos primeiros anos do ciclo da alfabetização (Torres et al., 2021; Macdonald et al., 2020). Ao diversificar e integrar as formas sensoriais de assimilação da informação, a aprendizagem deixa de se apoiar exclusivamente no sistema visual, o que favorece uma representação mais robusta das letras e de seus fonemas correspondentes.

Além disso, o sono, mesmo de curta duração, tem sido amplamente reconhecido pela literatura científica como um momento oportuno, em razão do aumento da reativação e consolidação em nível neural da memória, por desempenhar papel fundamental na permanência de novos conteúdos, (WAMSLEY, 2011). Assim, associar atividades multissensoriais à uma rotina de soneca no ambiente escolar pode constituir uma estratégia inovadora e de grande impacto pedagógico, especialmente quando aplicada em contextos reais de ensino, conduzida pelas próprias professoras.

Entretanto, é necessário ressaltar que os estudos que reúnem evidências da eficácia desse protocolo, foram realizados em ambientes controlados, em que os treinamentos foram aplicados de maneira individualizada, podendo não refletir inteiramente as condições concretas de uma escola.

Portanto, a pesquisa avalia não apenas a eficácia do protocolo no desenvolvimento da leitura e escrita, mas também sua viabilidade de aplicação em larga escala. Caso os resultados sejam positivos, as atividades propostas poderão ser incorporadas de forma sistemática ao cotidiano

escolar, extrapolando o campo experimental e consolidando-se como um instrumento pedagógico baseado em evidências. Tal perspectiva é essencial para o avanço das práticas educacionais, permitindo que a escola se aproxime cada vez mais de metodologias fundamentadas cientificamente e que ofereçam reais benefícios ao processo de alfabetização das crianças brasileiras.

Metodologia

O presente estudo foi delineado com o intuito de investigar a eficácia de atividades multissensoriais relacionadas a letras, associadas ao sono pós-treino, na melhoria da velocidade de leitura e na superação da invariância em espelho em crianças em fase de alfabetização. Então, a metodologia contempla a descrição do protocolo de intervenção, a caracterização dos sujeitos participantes, os critérios de participação, bem como os procedimentos de coleta, análise e registro de dados.

1. Treinamento multissensorial

As sessões de treino multissensorial tiveram duração de aproximadamente 30 minutos e ocorreram ao longo de três semanas consecutivas. Todas as atividades foram realizadas em sala de aula, com os estudantes acomodados em suas carteiras, em ambiente controlado e supervisionado por suas professoras, previamente capacitadas para a aplicação do protocolo.

Com o intuito de reduzir a predominância do sistema visual e favorecer a assimilação de sistemas sensoriais alternativos ao reconhecimento das letras, as crianças utilizaram vendas durante todo o treino. Três atividades principais compõem o protocolo:

A) Desenho em papel: cada estudante, guiado pela professora, executa movimentos com um lápis sobre uma folha em branco, inicialmente desenhando formas geométricas elementares (círculos, linhas, quadrados) e, posteriormente, realizando os gestos correspondentes à escrita de letras.

B) Desenho no ar: em seguida, as crianças são conduzidas a reproduzir os mesmos movimentos no espaço, utilizando os dedos para desenhar tanto formas simples quanto diferentes letras.

C) Percepção para ação: por fim, a professora exhibe a letra (b ou d, por exemplo), e as crianças levantam a mão esquerda ou direita em concordância com a orientação da forma da letra.

As atividades 1 e 2 foram realizadas em duas condições: primeiramente sem a emissão do som das letras, e posteriormente com a professora oralizando os fonemas correspondentes. O objetivo é integrar os sistemas motor, tátil, auditivo e vocal, favorecendo representações discriminantes para letras visualmente similares, como “b” e “d”.

Todas as sessões são registradas em vídeo e áudio, permitindo análise posterior tanto da aplicação das atividades quanto do desempenho individual e coletivo dos estudantes.

2. Sono pós-treino

O período de sono pós-treino foi incorporado proveitosamente aos períodos reservados nas escolas de tempo integral participantes, que ocorrem diariamente após o almoço, intervalo

delimitado em 2 horas. Nesse momento, as crianças foram convidadas a deitar-se em colchonetes e utilizar máscaras de sono, fornecidas para o experimento, a fim de reduzir estímulos luminosos e favorecer o adormecimento.

A supervisão ficou a cargo do funcionário da escola responsável por essa atividade em sua rotina regular, com acompanhamento da equipe de pesquisa. O período de descanso foi registrado em uma lista pelo supervisor e, posteriormente, será quantificado quanto à duração e frequência do sono efetivo.

3. Sujeitos da pesquisa e critérios de participação

Participaram do estudo crianças com idades entre 5 e 9 anos, regularmente matriculadas em escolas da rede pública de ensino, bem como suas respectivas professoras. A participação foi condicionada à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos responsáveis legais e de termos específicos de autorização para gravação de voz e imagem. As professoras envolvidas também assinaram TCLE e termos correspondentes, assegurando transparência e conformidade ética. Foram incluídas na pesquisa crianças entre 5 e 9 anos, de ambos os sexos, independentemente de cor, etnia, classe social ou orientação sexual. A exclusão se deu em crianças fora da faixa etária estabelecida ou com histórico/diagnóstico de condições neurológicas ou psiquiátricas que pudessem interferir nos resultados do estudo.

4. Análise de dados

Os dados coletados (desempenho nas atividades, registros audiovisuais, medidas de tempo de sono) foram submetidos a análise estatística. Foram empregados testes paramétricos quando as distribuições atenderem aos critérios de normalidade e homogeneidade de variâncias. No não cumprimento desses critérios, recorreu-se a testes não paramétricos, adotando nível de significância de $\alpha = 0,05$, com correção para múltiplas comparações.

Resultados e Discussões

(Anexo "Figura 1.png")
Figura 1.

Desempenho dos grupos Controle e Intervenção nas tarefas de discriminação de espelho. O gráfico (1) apresenta a taxa de erro em letras espelhadas, o gráfico (2) mostra a taxa de erro em símbolos espelhados, e o gráfico (3) exibe o tempo de resposta médio em letras espelhadas. Em todos os casos, são mostradas as três fases do estudo: pré-treino (Antes da intervenção), pós-treino imediato (Imediatamente após a intervenção) e pós-treino tardio (90 dias após a intervenção). Observa-se uma redução progressiva tanto na taxa de erros quanto no tempo de resposta, mas sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. O paralelismo entre letras e símbolos sugere que as melhorias foram gerais e provavelmente decorrentes de prática e familiarização com a tarefa, e não de um efeito seletivo do protocolo multissensorial associado ao sono.

Os resultados obtidos na tarefa visual de discriminação de letras e símbolos em espelho estão sintetizados na Figura 1, que representam, respectivamente, o desempenho dos participantes na taxa de erro para letras espelhadas, na taxa de erro para símbolos espelhados e no tempo de resposta em letras espelhadas. De maneira geral, observa-se que, embora nos grupos tenham ocorrido, tanto em letras quanto em símbolos, reduções graduais ao longo das fases experimentais, tais reduções ocorreram em ambos e não se traduziram em diferenças estatisticamente significativas entre eles. Em outras palavras, os gráficos evidenciam trajetórias de melhora que a princípio não devem ser atribuídas a um impacto diferencial do treino multissensorial associado ao sono.

A tarefa utilizada foi um paradigma de decisão binária chamada “igual-diferente”,

implementado em *PsychoPy*, no qual os participantes eram apresentados a pares de estímulos consecutivos na tela do computador e deveriam indicar, por meio de teclas de resposta, se os estímulos exibidos eram iguais ou diferentes. Ao todo, cada bloco experimental combinava 63 pares de estímulos distribuídos entre letras, símbolos, letras em espelho e símbolos em espelho, de forma a avaliar especificamente o fenômeno da invariância em espelho. Essa estrutura de tarefa, além de padronizar a comparação com o estudo de Torres et al., possibilita capturar tanto o desempenho em itens de natureza alfabética (letras) quanto não alfabética (símbolos), funcionando como um controle interno para verificar se os ganhos são seletivos ou apenas resultado de prática generalizada.

Na taxa de erro para letras espelhadas, comparando o grupo controle com o grupo intervenção, os testes de Mann-Whitney revelaram $p = 0,0657$ (Antes da intervenção), $p = 0,2364$ (Imediatamente após) e $p = 0,2043$ (90 dias após), todos acima do limiar de significância corrigido ($\alpha = 0,017$). Para símbolos espelhados, os valores também não atingiram significância ($p = 0,2675$; $p = 0,4705$; $p = 0,5123$). Esse paralelismo entre letras e símbolos indica que, se houve melhora, ela não foi seletiva para o domínio alfabético, mas refletiu um efeito geral de prática ou familiarização com a tarefa. Ou seja, é possível que os ganhos relatados possam ser provenientes de uma exposição repetida ao procedimento experimental e não necessariamente de um impacto diferencial do treino multissensorial associado ao sono.

Os resultados de tempo de resposta em letras espelhadas reforçam essa interpretação. Apesar de ambos os grupos apresentarem reduções graduais, as diferenças entre eles nunca foram estatisticamente significativas: $p = 0,0679$ antes da intervenção (Mann-Whitney), $p = 0,1522$ logo após a intervenção (teste t independente) e $p = 0,9910$ 90 dias após (Mann-Whitney). A ausência de significância, mesmo diante de trajetórias de melhora, sugere novamente que os ganhos decorreram de fatores gerais de prática, e não de um efeito diferencial da intervenção. Para ambos os grupos, partindo de testes de Wilcoxon de amostras pareadas, diferenças estatisticamente significativas seguindo $p < 0,05$ entre fases intragrupo não foram observadas para nenhuma das variáveis.

Conforme delineado na metodologia, a escolha dos testes estatísticos foi pautada pela verificação prévia das premissas de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene). Quando tais critérios foram atendidos, aplicaram-se testes paramétricos, como o t de Student para amostras independentes; quando não atendidos, recorreu-se a testes não paramétricos, como o Mann-Whitney. Além disso, para mitigar o risco de erro do tipo I decorrente de múltiplas comparações, foi adotada uma correção de Bonferroni, ajustando o limiar de significância de $\alpha = 0,05$ para $\alpha = 0,017$. Essa análise reforça a confiabilidade da conclusão de que as diferenças observadas não se sustentaram estatisticamente, ainda que visualmente os gráficos sugiram trajetórias de melhora.

Esse padrão contrasta com os achados de Torres et al. (2021), que observaram efeitos seletivos para letras espelhadas, mas não para símbolos espelhados após os testes de discriminação visual. No estudo deles, o treino multissensorial, seguido de soneca, levou a uma redução estável de erros em letras espelhadas, mas não em símbolos, revelando uma inibição específica da invariância em espelho. Uma diferença metodológica que é valiosa ressaltar é de que, no estudo de Torres e colaboradores, os grupos iniciaram com linhas de base semelhantes e relativamente altas, o que favoreceu a detecção de mudanças diferenciais. No presente estudo, por outro lado, ambos os grupos partiram de linhas de base inferiores; o

controle, por sua vez, partiu de um nível inicial de erros mais elevado que o grupo intervenção, o que confere maior potencial de melhora em decorrência do efeito da prática dos testes. Essa assimetria inicial pode ter mascarado efeitos sutis da intervenção, visto que esse grupo dispunha de menos margem para redução de erros quando comparado ao grupo controle.

Outro aspecto a ser considerado refere-se à perda de participantes no grupo controle durante a coleta dos testes imediatamente após a intervenção, ocasionada por problemas de logística escolar. Tal redução amostral diminuiu a robustez da comparação justamente na fase mais crítica para observar efeitos iniciais da intervenção, tornando o teste menos sensível a eventuais diferenças entre os grupos. Esses dois fatores, que são a assimetria inicial de desempenho e a perda de sujeitos, contribuem para explicar por que os efeitos seletivos descritos por Torres et al. não foram replicados na presente amostra.

Adicionalmente, é importante salientar que a própria assimetria nas linhas de base entre os estudos pode estar relacionada ao contexto histórico em que as coletas foram realizadas. O trabalho de Torres et al. (2021) ocorreu antes da pandemia de COVID-19, ao passo que o presente estudo foi conduzido em um cenário pós-pandêmico. Nesse período, muitas crianças passaram a ter maior contato com dispositivos digitais, devido ao ensino remoto e à intensificação do uso de tablets, celulares e computadores (Rodrigues et al, 2025). Esse aumento da familiarização com aparelhos e tarefas mediadas por tecnologia pode ter reduzido a taxa de erro inicial em alguns participantes. Portanto, é plausível que esse fator histórico tenha contribuído para a diferença de linha de base entre os trabalhos, dificultando a comparação direta com estudos anteriores.

Entretanto, não se deve concluir de forma precipitada uma ausência de eficácia do protocolo. É necessário considerar que o processo de alfabetização e a inibição da invariância em espelho são fenômenos complexos e multifatoriais, cuja expressão não se restringe a tarefas de discriminação perceptiva, e em razão disso foram adotados outros métodos de avaliação, tal qual o de cópia das letras, que consiste em escrever uma sequência de letras apresentadas, como também testes de velocidade de leitura, que corresponde ao fator que é núcleo do estudo. Medidas mais próximas do contexto real da leitura, como produção da escrita das letras e fluência leitora, são mais sensíveis para captar os impactos de intervenções pedagógicas. De fato, no estudo de Torres et al., a seletividade para letras tornou-se ainda mais clara quando analisados os erros de invariância em espelho na escrita.

Além disso, é importante destacar novamente que enquanto o estudo de Torres et al. implementou o treinamento multissensorial de forma individualizada, com cada criança recebendo instrução direta em sessões controladas, a presente pesquisa buscou testar a eficiência do mesmo protocolo em larga escala com menor manipulação de variáveis, em condições congruentes com a realidade natural escolar. Aqui, o treinamento foi conduzido por professores, aplicando o protocolo simultaneamente a toda a turma. Essa mudança de escala é metodologicamente relevante porque permite avaliar a viabilidade de aplicação do treino multissensorial em contextos educacionais reais, mas ao mesmo tempo pode introduzir variações no engajamento individual, na atenção às instruções e na aderência dos professores ao protocolo. Assim, parte da ausência de efeitos diferenciais também pode estar relacionada não apenas às diferenças de linha de base, mas à própria transição entre um modelo experimental altamente controlado e um modelo ecológico de aplicação em sala de aula.

Nesse sentido, as análises subsequentes dessa pesquisa terão papel decisivo para uma compreensão mais abrangente dos efeitos do protocolo. Além das variáveis já previstas, como o tempo de sono pós-treino, o teste de escrita de letras e a velocidade de leitura, também serão examinadas as filmagens realizadas durante os treinamentos multissensoriais. Esse material permitirá verificar dois aspectos de grande relevância: (a) o nível de participação e engajamento das crianças durante as atividades, fator que pode influenciar diretamente a consolidação da aprendizagem, e (b) o desempenho e a aderência dos professores ao protocolo, uma vez que a eficácia de intervenções educacionais depende em grande medida da forma como são conduzidas no ambiente escolar. Essa análise qualitativa poderá esclarecer se a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos se deveu também a variações na implementação prática da intervenção.

Como também, considerar o papel do sono como variável mediadora é crucial. A literatura sugere que o sono pós-treino desempenha papel fundamental na reativação neural e na consolidação da memória (Wamsley, 2011). Assim, a análise dos dados obtidos da frequência e tempo de sono efetivo de cada participante poderá revelar se a ausência de efeitos seletivos decorre de um déficit nesse componente essencial do protocolo.

Dessa forma, embora os resultados iniciais apontem para ganhos não específicos e de natureza provavelmente não advinda da intervenção, a análise das próximas variáveis, incluindo tanto medidas quantitativas (sono, escrita, leitura) quanto qualitativas (filmagens das sessões) terá papel fundamental na avaliação do real impacto do treino multissensorial associado ao sono no processo de inibição da invariância em espelho e na promoção do aumento da velocidade de leitura.

Conclusão

Os resultados deste estudo indicam que, embora ambos os grupos tenham apresentado reduções progressivas na taxa de erros em letras e símbolos espelhados, bem como nos tempos de resposta de letras espelhadas no teste de discriminação visual, tais melhorias não se traduziram em diferenças estatisticamente significativas entre as condições de intervenção e controle. Esse padrão sugere que os ganhos observados não decorrem necessariamente de um impacto direto do treino multissensorial associado ao sono. A análise das variáveis de sono e dos demais testes que avaliam tanto a invariância em espelho quanto a velocidade de leitura será fundamental para conclusões mais substanciais.

A transição do protocolo criado por Torres et al. (2021) para uma versão mais coerente com o ambiente escolar é crucial para a aplicabilidade em contextos educacionais reais, mas também introduz maior variabilidade no engajamento dos alunos e na aderência dos professores ao protocolo. Somada à assimetria inicial de desempenho entre os grupos e à perda amostral no pós-teste imediato, tal mudança pode ter mascarado efeitos diferenciais da intervenção.

Outro aspecto a ser considerado é o contexto histórico distinto em que as pesquisas foram realizadas. O presente estudo ocorreu em cenário pós-pandêmico, período em que muitas crianças ampliaram sua familiaridade com dispositivos digitais devido a maior exposição a telas. Isso pode ter sido fator de redução das taxas de erro iniciais no teste analisado,

resultando em linhas de base mais baixas e menos propensas a apresentar variações significativas após a intervenção.

Apesar da ausência de efeitos estatisticamente robustos nesta fase inicial, não se pode descartar a relevância pedagógica do protocolo. A alfabetização e a superação da invariância em espelho são fenômenos que transcendem tarefas perceptivas restritas. Assim, medidas mais próximas do cotidiano escolar, como testes de escrita e fluência leitora, têm maior potencial de capturar os efeitos de intervenções multissensoriais. Ademais, a análise das filmagens das sessões fornecerá dados qualitativos valiosos sobre o engajamento das crianças e a implementação prática pelos professores, fator determinante pois pode indicar adaptações ao protocolo, contribuindo para adequá-lo a uma aplicação de larga escala.

Por fim, a inclusão do sono como variável mediadora é componente essencial deste protocolo. Estudos prévios reforçam seu papel na reativação neural e na consolidação da memória, de modo que os registros obtidos da duração e frequência do sono poderão esclarecer se a ausência de significância e seletividade nos efeitos está relacionada a déficits na prática desse componente.

Dessa maneira, conclui-se que, embora os resultados quantitativos iniciais não evidenciem efeitos específicos do protocolo, as análises complementares citadas anteriormente serão decisivas para determinar o real impacto do treino multissensorial associado ao sono no processo de alfabetização.

Referências

INSTITUTO NACIONAL DE ESTUDOS E PESQUISAS EDUCACIONAIS ANÍSIO TEIXEIRA (INEP). Alfabetiza Brasil: resultados da avaliação da alfabetização 2023.

Brasília: INEP, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inep/pt-br/assuntos/avaliacao-e-exames-educacionais/alfabetiza-brasil>. Acesso em: 28 ago. 2025.

PEGADO, F.; NAKAMURA, K.; COHEN, L.; DEHAENE, S. Breaking the symmetry: mirror discrimination for single letters but not for words in the visual word form area.

NeuroImage, v. 55, n. 2, p. 742-749, 2011. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.11.043>.

PEGADO, Felipe; NAKAMURA, Kimihiro; HANNAGAN, Thomas. How does literacy break mirror invariance in the visual system? Frontiers in Psychology, v. 5, p. 703, 2014.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00703>.

TORRES, A. V. et al. Selective inhibition of mirror invariance for letters consolidated by sleep doubles reading fluency. Current Biology, v. 31, n. 4, p. 742–752.e8, 22 fev. 2021.

DOI: [10.1016/j.cub.2020.11.031](https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.11.031).

PEGADO, F.; TORRES, A. R.; WEISSHEIMER, J.; RIBEIRO, S. A protocol to examine the learning effects of ‘multisystem mapping’ training combined with post-training sleep consolidation in beginning readers. STAR Protocols, v. 2, n. 3, p. 100712, set. 2021.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100712>.

MACDONALD, K.; MILNE, N.; ORR, R.; POPE, R. Associations between motor proficiency and academic performance in mathematics and reading in year 1 school children:

a cross-sectional study. BMC Pediatrics, v. 20, n. 1, p. 69, dez. 2020. DOI: 10.1186/s12887-020-1967-8.

WAMSLEY, E. J.; STICKGOLD, R. Memory, sleep and dreaming: experiencing consolidation. Sleep Medicine Clinics, v. 6, n. 1, p. 97-108, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsmc.2010.12.008>.

RODRIGUES, Anniely; BRITO, Paloma Karen Holanda; BEZERRA, Iolanda Carlli da Silva; REICHERT, Lucas Pereira; SANTOS, Nathanielly Cristina Carvalho de Brito; COLLET, Neusa; BATISTA DOS SANTOS, Paula Fernanda Brandão; REICHERT, Altamira Pereira da Silva. Repercussão da pandemia da Covid-19 no uso de telas na primeiríssima infância. Revista Gaúcha de Enfermagem, Porto Alegre, v. 44, e20230012, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-1447.2023.20230012.en>. Acesso em: 30 ago. 2025.

Anexos

FIGURA 1

CÓDIGO: HS1813

AUTOR: CAIO FÁBIO MEDEIROS MAGALHÃES

ORIENTADOR: SIDARTA TOLLENDAL GOMES RIBEIRO

TÍTULO: Desenvolvimento de um jogo de videogame que evoque sonhos

Resumo

Esse plano de trabalho objetiva a criação de um jogo eletrônico que será utilizado em experimentos envolvendo eletroencefalografia (EEG) antes e depois de um período de sono. O jogo será planejado de forma a ser atraente e que evoque sonhos. Os eventos do jogo precisam ser registrados em arquivo e sincronizados com o equipamento de EEG, para facilitar o estudo das influências mútuas entre o jogo e o sono

Palavras-chave: Desenvolvimento de jogo, Unreal Engine, Sono, Sonhos, EEG

TITLE: Development of a video game that evokes dreams

Abstract

This work plan aims to create a video game that will be used in experiments involving electroencephalography (EEG) before and after a period of sleep. The game will be designed to be engaging and dream-inducing. Game events must be recorded and synchronized with EEG equipment to facilitate the study of the mutual influences between the game and sleep.

Keywords: Game Development, Unreal Engine, Sleep, Dreams, EEG

Introdução

Para que serve o sonho? Diversas teorias buscam responder essa pergunta. Destacamos uma dessas teorias, proposta por Revonsuo, que tem sido corroborada por muitas pesquisas. Chamada de Teoria de Simulação de Ameaças (TSA), postula que o sonho é um mecanismo de defesa preservado ao longo da evolução dos animais por usa capacidade de simular ameaças, preparando o animal antecipadamente para a ocorrência de ameaças reais (REVONSUO, 2000).

E para que serve o sono? A importância do sono para a consolidação de memórias também está cada vez mais consolidada na literatura científica, assim como sua função para a eliminação de toxinas (DIEKELMANN; BORN, 2010). Essas funções são tão importantes para os seres vivos, que o sono pode ser encontrado em uma grande variedade de animais, incluindo mamíferos, aves, répteis, peixes e até invertebrados (KEENE; DUBOUE, 2018).

Desse modo, tanto o sono como o sonho teriam funções que atuariam como mecanismos de sobrevivência dos animais. Isso gera a hipótese de que devem existir diferenças no sono e nos sonhos entre presas e predadores.

Em relação ao sono, um ponto a favor dessa hipótese é que as pesquisas científicas indicam que mamíferos e aves apresentam maior predominância dos estágios mais leves do sono ao

dormir após um aumento na percepção de situações de risco de predação (LIMA et al., 2005). Contudo, em relação aos sonhos, trata-se de uma questão mais difícil de ser investigada em animais não-humanos, já que eles não podem nos relatar quando eles ocorrem.

Porém, essa é uma situação diferente no caso de humanos, pois eles podem relatar tanto a ocorrência dos sonhos, como seus conteúdos. Uma segunda vantagem no uso de humanos para investigar essa hipótese é que o ser humano pode ser visto tanto como presa, como predador. Em frente a um tigre, podemos ser presas, enquanto em frente a uma galinha, podemos ser predadores. Um terceiro benefício de envolver participantes humanos são as suas capacidades de executar tarefas complexas em uma situação simulada através de jogos eletrônicos.

Nesse sentido, esse projeto de iniciação científica faz parte de uma pesquisa que busca estudar a função dos sonhos e do sono em participantes humanos colocados em situações de presa ou predador através de um jogo de videogame.

Uma primeira etapa da pesquisa envolveu a utilização do jogo F.E.A.R. Combat, disponível gratuitamente na internet. Algumas opções do jogo foram alteradas de modo a simular uma disputa entre presa e predador. Os participantes se confrontavam em pares, jogando em computadores conectados em rede. Após uma partida de 45 minutos, os participantes dormiam no laboratório por 2 horas e logo em seguida voltavam a jogar mais uma partida de 45 minutos.

Os resultados apontam que quanto mais os sonhos das presas está relacionado ao jogo, melhor elas desempenham no segundo jogo. Além disso, o ganho de desempenho das presas também é correlacionado com a potência das ondas lentas durante o sono. Nenhum resultado foi encontrado para os predadores. A falta de resultados encontrados ao avaliar os predadores não é capaz de levar à conclusão de que eles não são beneficiados pelo sono e pelos sonhos, pois isso pode ter ocorrido por limitações do tamanho da amostra ou por escolhas metodológicas. Contudo, pode-se concluir que a investigação das funções do sono e dos sonhos é muito mais facilitada ao avaliar presas do que predadores.

A partir desse primeiro estudo, foi verificada a importância de desenvolver um jogo eletrônico especificamente planejado para essa investigação. Com isso, em 2018, foi iniciada a implementação desse novo jogo. Dados os resultados encontrados, o jogo têm sido desenvolvido visando a execução de tarefas que façam os participantes vivenciar o papel de ser uma presa.

Paralelamente está sendo conduzida uma pesquisa que está aplicando questionários online de forma a identificar quais aspectos do jogo mais promovem a ocorrência de sonhos, e não perturbam o sono, além de promover sonhos

Metodologia

O jogo desenvolvido até o momento utiliza a plataforma Unreal Engine, capaz de criar jogos tridimensionais com alta qualidade gráfica e nível de realismo. Foi criado um ambiente tridimensional, que será aperfeiçoado em trabalhos paralelos e futuros. A programação dos mecanismos do jogo está sendo desenvolvida utilizando o recurso denominado blueprints, o

qual permite realizar a implementação do jogo através de programação visual, sem contato direto com nenhuma linguagem de programação. A proposta é que o restante do jogo seja implementado utilizando o mesmo recurso, já que ela possibilita uma implementação mais rápida.

No jogo atual, o jogador estará em um ambiente assustador, onde é perseguido por um fantasma com uma foice, denominado ceifador, enquanto objetos flutuam controlados por forças ocultas e se movem em direção ao jogador. O ceifador faz o papel do predador, enquanto os objetos servem como obstáculos para deixar o jogo mais interessante.

A mecânica do jogo de videogame atualmente se encontra em etapa de acabamento. Precisam ser elaboradas estratégias para controlar o nível de dificuldade do jogo. Esse será um parâmetro a ser controlado durante os experimentos, possivelmente variando de acordo com a habilidade prévia do jogador, que será avaliada através de testes com um outro jogo de videogame.

Resultados e Discussões

As seguintes funcionalidades foram acrescentadas ao jogo em desenvolvimento durante esse projeto de iniciação científica:

1. Texturas

As texturas das paredes, materiais emissivos e menus sofreram alterações ou trocas de material.

2. Build

Foram gerados "development builds" Para verificar como o jogo seria para o usuário final, em um PC padrão com Windows 10/11.

3. Refind

O sistema de IA do inimigo recebeu um balanceamento no qual a cada intervalos de segundo variáveis (baseados em dificuldade), o inimigo volta a perseguir o jogador por alguns segundos, para se aproximar mais do jogador e facilitar um possível encontro.

Conclusão

O desenvolvimento do jogo eletrônico destinado a explorar a relação entre contextos de predador e presa e a experiência de sonhos e sono está avançando conforme o planejamento. A fase inicial do projeto, que utilizou o jogo "F.E.A.R. Combat", forneceu insights importantes, mas também destacou a necessidade de um jogo projetado especificamente para esta pesquisa. Os dados preliminares sugerem que a simulação de ameaças pode afetar o sono e os sonhos de maneira diferenciada, com benefícios aparentes para as presas em termos de frequência e profundidade dos sonhos. No entanto, a ausência de resultados claros para os predadores aponta para a necessidade de mais desenvolvimento e testes. O novo jogo, sendo desenvolvido com o Unreal Engine 5, visa criar uma simulação mais fiel e controlada das experiências de predador e presa. A programação em blueprints e o aprimoramento dos ambientes e mecânicas do jogo são etapas cruciais para alcançar os objetivos da pesquisa. A

coleta de dados adicionais por meio de questionários ajudará a identificar características do jogo que podem influenciar a ocorrência de sonhos sem perturbar o sono. À medida que o desenvolvimento do jogo avança, a expectativa é que ele forneça uma ferramenta valiosa para investigar as funções evolutivas do sono e dos sonhos. A próxima fase do projeto, que incluirá experimentos com o novo jogo, será fundamental para validar as hipóteses formuladas e expandir nossa compreensão sobre como os contextos de ameaça afetam a experiência onírica e a qualidade do sono. O progresso contínuo e a integração das descobertas da pesquisa paralela garantirão que o jogo atenda aos requisitos para gerar dados significativos e contribuir para o conhecimento científico na área do sono e dos sonhos.

Referências

O desenvolvimento do jogo eletrônico destinado a explorar a relação entre contextos de predador e presa e a experiência de sonhos e sono está avançando conforme o planejamento. A fase inicial do projeto, que utilizou o jogo “F.E.A.R. Combat”, forneceu insights importantes, mas também destacou a necessidade de um jogo projetado especificamente para esta pesquisa. Os dados preliminares sugerem que a simulação de ameaças pode afetar o sono e os sonhos de maneira diferenciada, com benefícios aparentes para as presas em termos de frequência e profundidade dos sonhos. No entanto, a ausência de resultados claros para os predadores aponta para a necessidade de mais desenvolvimento e testes. O novo jogo, sendo desenvolvido com o Unreal Engine 5, visa criar uma simulação mais fiel e controlada das experiências de predador e presa. A programação em blueprints e o aprimoramento dos ambientes e mecânicas do jogo são etapas cruciais para alcançar os objetivos da pesquisa. A coleta de dados adicionais por meio de questionários ajudará a identificar características do jogo que podem influenciar a ocorrência de sonhos sem perturbar o sono. À medida que o desenvolvimento do jogo avança, a expectativa é que ele forneça uma ferramenta valiosa para investigar as funções evolutivas do sono e dos sonhos. A próxima fase do projeto, que incluirá experimentos com o novo jogo, será fundamental para validar as hipóteses formuladas e expandir nossa compreensão sobre como os contextos de ameaça afetam a experiência onírica e a qualidade do sono. O progresso contínuo e a integração das descobertas da pesquisa paralela garantirão que o jogo atenda aos requisitos para gerar dados significativos e contribuir para o conhecimento científico na área do sono e dos sonhos.

CÓDIGO: SB0285

AUTOR: MARCUS VINICIUS DUARTE E SILVA

ORIENTADOR: DRAULIO BARROS DE ARAUJO

TÍTULO: DOSIMETRIA DA N,N-DMT INALADA EM DISPOSITIVO VAPORIZADOR PARA USO EM PESQUISA CLÍNICA COM HUMANOS

Resumo

Ensaio clínico realizado tem demonstrado respostas antidepressivas rápidas a substâncias psicodélicas. Nosso grupo é pioneiro na condução de estudos clínicos com a N,N-Dimetiltriptamina (DMT) em voluntários saudáveis e pacientes com depressão resistente ao tratamento. A via inalada oferece vantagens por ser não invasiva e ter rápida absorção, logo, tem sido escolhida em pesquisas clínicas que usaram DMT ou 5-MeO-DMT. No entanto, existe uma lacuna entre a dose colocada no dispositivo vaporizador e a dose-alvo de entrega à qual o participante será efetivamente exposto. O vaporizador escolhido é o Volcano (da Storz and Bickel, Alemanha), um sistema com ventilador aquecido que passa por uma câmara onde são colocados os cristais de DMT na forma de base livre. A substância é vaporizada e coletada em um balão de 2 litros, do qual o participante deve inalar.

Este projeto tem como objetivos descrever o processo de extração e isolamento de N,N-Dimetiltriptamina a partir da *Mimosa tenuiflora* e determinar a quantidade de DMT veiculada pelo vaporizador efetivamente recebida pelo participante. Para isso, serão realizados experimentos envolvendo a criação de um protocolo de recuperação de DMT, análise da retenção relativa no vaporizador e avaliação da capacidade de vaporização da droga. As quantidades de DMT vaporizado serão quantificadas por HPLC-FLD e GC-MS. Serão analisadas diferentes doses de DMT (7,5; 15; 30; 60 mg) para correlacionar a dose carregada e a dose vaporizada.

Palavras-chave: N,N-Dimetiltriptamina. Extração. Vaporização.

TITLE: DOSIMETRY OF INHALED N,N-DMT USING A VAPORIZER DEVICE FOR CLINICAL RESEARCH IN HUMANS

Abstract

Clinical trials have demonstrated rapid antidepressant responses to psychedelic substances. Our group is a pioneer in conducting clinical studies with N,N-Dimethyltryptamine (DMT) in healthy volunteers and patients with treatment-resistant depression. The inhaled route offers advantages for being non-invasive and having rapid absorption, and thus has been chosen in clinical research using DMT or 5-MeO-DMT. However, there is a gap between the dose

placed in the vaporizing device and the target delivery dose to which the participant is actually exposed.

The chosen vaporizer is the Volcano (by Storz and Bickel, Germany), a fan-assisted heating system that passes through a chamber where DMT crystals in freebase form are placed. The substance is vaporized and collected in a 2-liter balloon, from which the participant is instructed to inhale.

This project aims to describe the process of extraction and isolation of N,N-Dimethyltryptamine from *Mimosa tenuiflora*, and to determine the amount of DMT delivered by the vaporizer that is effectively received by the participant. To this end, experiments will be conducted involving the creation of a DMT recovery protocol, analysis of relative retention in the vaporizer, and assessment of the drug's vaporization efficiency. The vaporized DMT amounts will be quantified using HPLC-FLD and GC-MS. Different DMT doses (7.5; 15; 30; 60 mg) will be analyzed to correlate the loaded dose and the vaporized dose.

Keywords: N,N-Dimethyltryptamine. Extraction. Vaporization.

Introdução

Alcalóides são subprodutos metabólicos comumente resultantes das transformações químicas em vegetais. São moléculas cuja rota biossintética se inicia a partir de aminoácidos que apresentam características alcalinas e, essas substâncias usualmente, exibem atividades biológicas. Nesse contexto, as triptaminas representam um grupo de alcalóides com propriedades psicodélicas, os quais vêm demonstrando avaliações positivas quanto à segurança e à resposta terapêutica em pacientes com transtornos mentais. Nesse contexto, a N,N-Dimetiltryptamina (DMT) é um alcaloide do grupo das triptaminas. Essa substância foi avaliada em ensaios clínicos conduzidos por nosso grupo, os quais sugerem efeitos antidepressivos rápidos e significativos em pacientes com depressão resistente ao tratamento.

Outrossim, a DMT exerce seus efeitos por meio da ação agonista serotoninérgica sobre os receptores 5-HT_{1A/2A/2C}, modulando vias neurais relacionadas ao humor e à cognição o que pode explicar seus efeitos promissores em ensaios clínicos. Além disso, sob o viés da química, a DMT pode ser extraída, isolada e purificada em laboratório a partir das cascas de raízes e cascas internas de uma espécie vegetal típica do semiárido nordestino brasileiro, a *Mimosa tenuiflora*. A obtenção de frações fitoquímicas desse composto bioativo tem sido realizada pela aplicação da técnica de extração líquido-líquido, utilizando-se do solvente orgânico n-hexano para a extração seletiva da DMT em sua forma de base livre (Gaujac, 2013). A aplicação desse método extrativo possibilita a obtenção de frações purificadas para estudos farmacológicos e aplicações terapêuticas.

Este projeto visa então descrever o processo de extração e isolamento de N,N-Dimetiltryptamina (DMT) a partir da *Mimosa tenuiflora* e a avaliação de um dispositivo de vaporização para administração pulmonar de DMT, a fim de compreender os parâmetros associados à vaporização dessa substância visando avaliar eficiência de administração e custos para veiculação de DMT por meio desse dispositivo. Não obstante, o vaporizador escolhido é o Volcano (da Storz and Bickel, Alemanha), que consiste em um sistema com

ventilador aquecido que passa por uma câmara onde são colocados os cristais de DMT na forma de base livre. A substância é vaporizada e coletada em um balão de 2 litros, do qual o participante deve inalar. O projeto também visa esclarecer a relação entre a dose colocada no dispositivo vaporizador e a dose-alvo de entrega à qual o participante será efetivamente exposto.

Nossa hipótese é que existem grandes perdas no processo de vaporização de DMT, portanto, buscamos reduzir essas perdas, aumentar a eficiência na veiculação das doses administradas, aumentando a economia dos materiais utilizados e fornecendo base teórico-prática para compreender melhor a relação dose e efeito de DMT quando administrada via pulmonar.

Metodologia

ANÁLISE EM HPLC

Não obstante, amostras de N,N-Dimetiltriptamina oriundas do vulcano foram analisadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O padrão de DMT da Cayman Chemical (lote 13959) foi utilizado para produzir uma curva de calibração para demais análises realizadas. Um sistema Agilent 1260 LC (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canadá) foi usado para análise cromatográfica.

A coluna Luna® Omega (100 mm × 3.0 mm, 3 µm, Phenomenex) foi aplicada sob uma fase móvel com fluxo de 0.5 ml/min em temperatura ambiente (separação e detecção). A composição da fase móvel foi (A) água e (B) metanol. Nesse sentido, 0.1% de ácido fórmico foi adicionado à água e ao metanol. O tempo total de análise foi de 10 min, com o seguinte gradiente: 0-3 min, 50- 100% B; 3- 4,5 min, 100% B; 4,5- 5,5 min, 100- 50% B; 5,5- 10 min, 50% B. A temperatura foi mantida a 25° C (separação e detecção). O volume de injeção da amostra foi de 2 µL e os componentes foram quantificados com base nos picos nas áreas de 223 nm.

EXTRAÇÃO DE N,N-DIMETILTRIPTAMINA

A partir da entrecasca das raízes de *Mimosa tenuiflora* foi isolado a N,N-Dimetiltriptamina por meio de uma extração em meio básico (Rossi et al., 2019). Nesse sentido, após a pulverização das cascas internas das raízes, foi obtido um pó de granulometria variada que foi uniformizada para 75 µm, o pó foi suspenso em NaOH 0,5 M em uma proporção de 0,1 g de pó/mililitro de solução alcalina (Balança analítica ATX-224, Shimadzu, Japão). Após terem sido deixadas em agitação orbital por 24 horas à temperatura ambiente (25 °C) a mistura alcalina passou por um processo de filtração simples e o material sólido residual foi desprezado. Foi adicionado hexano duas vezes na solução aquosa alcalina permitindo assim a produção de uma fase orgânica concentrada de N,N-DMT, a proporção de solução aquosa:hexano (v/v) foi de 2,5:1. A fase orgânica foi separada da fase aquosa e concentrada sob pressão reduzida até o volume de 10 ml por meio de um Evaporador rotativo, modelo RV 3 eco drive, IKA, Alemanha. Ademais, o volume de hexano concentrado foi mantido sob refrigeração a -20 °C ao abrigo da luz a fim de permitir a cristalização no fundo do recipiente em que a fase orgânica foi armazenada.

Por fim, após 24 horas sob refrigeração foi possível perceber a formação de cristais amarelos claros no fundo do recipiente, esses cristais foram isolados do restante do solvente orgânico o qual foi devidamente descartado e os cristais formados foram dissolvidos em heptano e levados para aquecimento em chapa aquecedora (Agitador magnético com aquecimento, SSAGa 10L, Solidsteel) em capela de exaustão. Em seguida, depois da dissolução dos cristais em heptano formou-se um precipitado gorduroso no fundo do recipiente que foi descartado e somente o solvente orgânico foi armazenado novamente sob refrigeração a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para permitir a recristalização da N,N-Dimetiltriptamina.

PROTOCOLO DE RECUPERAÇÃO DE N,N-DIMETILTRIPTAMINA

A fim de estabelecer um protocolo para avaliação do dispositivo vaporizador, foram testados meios para compreender a extração do DMT do liquid pad, uma malha metálica de fios de aço inoxidável da qual é possível impregnar a droga. O processo de limpeza dos liquid pads consiste na solubilização da N,N-Dimetiltriptamina em etanol e impregnação nas malhas metálicas com posterior secagem na geladeira. Após a secagem, cada liquid pad é submerso em 10 mL de etanol em banho ultrassônico por 10 minutos, esse processo foi repetido cinco vezes ao final de cada lavagem foram retiradas alíquotas para análise quantitativa.

RETENÇÃO RELATIVA DE N,N-DIMETILTRIPTAMINA

A partir da impregnação de DMT de 7 liquid pads - dois impregnados com 30 mg, dois impregnados com 50 mg e três impregnados com 100 mg - foi possível analisar o perfil de retenção de DMT nas malhas metálicas para vaporização da droga. O protocolo de vaporização consistiu na ventilação dos liquid pads na temperatura de 200°C por 10 segundos no dispositivo vaporizador. Imediatamente após a vaporização, os liquid pads tiveram a droga impregnada extraída aplicando-se o protocolo de limpeza e alíquotas foram retiradas para análise quantitativa.

AValiação DO DISPOSITIVO VAPORIZADOR

O processo de vaporização consiste na solubilização da N,N-Dimetiltriptamina em etanol e impregnação no liquid pad, com posterior secagem na geladeira. O protocolo para vaporização da substância segue com a avaliação do balão antes de ser inflado com a DMT para controle de vazamento. Para vaporização a DMT e coleta do vapor o dispositivo vaporizador foi aquecido até 200°C , o liquid pad foi inserido na câmara de enchimento, o vulcano tem então sua ventilação iniciada por 10 segundos até que um vapor branco seja visualizado, nesse momento o balão é acoplado a câmara de enchimento permitindo ser insuflado com o vapor da DMT por 10 segundos. Imediatamente após esse procedimento o conteúdo do balão foi borbulhado em um recipiente contendo um volume pré-definido de etanol.

Em sequência, a DMT é extraída da câmara de enchimento, do bocal do balão, e do balão. O protocolo de extração da DMT dos elementos de vaporização consistiu na submersão em

recipientes contendo etanol em banho ultrassônico por 15 minutos, em seguida foram retiradas alíquotas para análise quantitativa.

Resultados e Discussões

PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE N,N-DIMETILTRIPTAMINA

A metodologia de extração de N,N-DMT tem sido utilizada ao longo dos anos pelo grupo de pesquisa e como afirmado anteriormente segue o método direto da base, como descrito por Rossi et al. (2019). A extração e isolamento da substância é um método de fácil aplicação e reprodutibilidade, além de garantir a formação da droga de interesse apresentando um baixo teor de impurezas. Ademais, o rendimento das extrações variou entre 0,01% e 0,64% (g/g) após sucessivas recristalizações. Sob esse viés, Nicasio et al., 2005 descreve que a variabilidade do teor de N,N-Dimetiltriptamina na entrecasca das raízes da *Mimosa tenuiflora* se deve pela coleta do material vegetal que foi realizado em diferentes épocas do ano, tendo em vista que os níveis desse alcalóide podem variar ao longo do ano tendo relação direta com o estresse hídrico e a temperatura.

TESTE DE RECUPERAÇÃO DOS LIQUID PADS

A partir da aplicação do protocolo de recuperação da N,N-Dimetiltriptamina impregnada nos liquid pads foi possível estabelecer que não importando a quantidade de substância impregnada a malha metálica 3 lavagens são o suficiente para retirar toda DMT presente nos pads. Nesse sentido, o protocolo aplicado foi a impregnação de cinco malhas metálicas usadas para vaporização da DMT, cada malha foi submetida a cinco lavagens sucessivas em etanol no banho ultrassônico, cada lavagem durou 10 minutos. Foram preparados cinco liquid pads dos quais dois foram impregnados com 30 mg e os demais com 100 mg da droga. Após cada lavagem foram retiradas alíquotas para análise quantitativa em HPLC para isso foi aplicado uma curva de calibração realizada com o padrão de DMT da Cayman Chemical (lote 13959).

Não obstante, um dado curioso que se pode perceber foi que logo após a primeira lavagem dos liquid pads a maior parte da DMT impregnada foi recuperada, e que após três lavagens toda substância foi recuperada. Ademais, vale destacar que houveram diferenças no perfil de liberação da substância entre os pads impregnados com 30 e 100 mg, de modo que o pad impregnado com 30 mg apresentou uma liberação inicial da droga maior que o liquid pad impregnado com 100 mg. Esse resultado sugere que a quantidade inicial impregnada a malha metálica influencia diretamente na cinética de desprendimento da substância.

Quanto às condições de operação, as malhas metálicas foram subdivididas em dois grupos, os liquid pads A (30 mg), B (100 mg) e C (100 mg) e os liquid pads D (30 mg) e E (100 mg), para o primeiro grupo as cinco lavagens foram realizadas com 10 mL de etanol enquanto que para o segundo grupo foi aplicado 30 mL de etanol e apenas três lavagens. Como consequência o segundo grupo foi capaz de retirar uma quantidade maior de DMT dos pads na primeira lavagem mas sem diferenças significativas que justificassem a utilização de mais solvente.

AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO RELATIVA DE N,N-DIMETILTRIPTAMINA

Objetivando compreender a retenção relativa de DMT em liquid pads foram preparados dois impregnados com 30 mg, dois impregnados com 50 mg e três impregnados com 100 mg e submetidos a vaporização na temperatura de 200° C por 10 segundos no dispositivo vaporizador. Em continuidade, imediatamente após a vaporização, os liquid pads tiveram a DMT impregnada extraída por meio do protocolo de limpeza estabelecido e alíquotas foram retiradas para análise quantitativa.

Sob esse viés, observa-se uma tendência clara quando se avalia a proporção de DMT que permaneceu retido nos pads em relação à quantidade inicial impregnada, quanto maior a massa inicial de DMT impregnada na malha metálica, menor a proporção retida ao final da vaporização. Esse comportamento sugere que os pads possuem uma capacidade limitada de retenção de DMT. Ainda assim, fatores operacionais podem influenciar nos resultados.

EFICIÊNCIA DE VAPORIZAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE DMT

Foi colocado em prática até o momento somente a metodologia de impregnação, recuperação da droga em malhas metálicas e avaliação da vaporização da substância. Nesse sentido, a partir da análise do conteúdo borbulhado do balão em um recipiente contendo álcool etílico, e posterior extração de N,N-DMT das demais partes do dispositivo vaporizador no banho ultrassônico possível avaliar que 47% quantidade de DMT impregnada aos pads inicialmente foi evaporada. Desses 47%, 35% ficou no ar borbulhado, esclarecendo que ao menos a maior parte do vapor de DMT é veiculado para o paciente, ainda assim não é possível afirmar que toda essa quantidade de substância é realmente absorvida, as demais partes do dispositivo vaporizador retiveram o restante da substância.

Por fim, ainda não foi possível determinar com certeza a eficiência de administração e custos para veiculação de DMT, bem como também não foi possível esclarecer a relação entre a dose veiculada no dispositivo vaporizador e a dose-alvo de entrega à qual o participante será efetivamente exposto. Isso se deve a necessidade de readequação dos métodos analíticos aplicados para análise e quantificação das amostras produzidas.

Conclusão

Esse projeto permitiu a extração de N,N-Dimetiltriptamina a partir das cascas internas das raízes da *Mimosa tenuiflora* em meio básico, a aplicação de uma metodologia simples e rápida resultou em rendimentos entre 0,01% e 0,64%. Ademais, esse projeto também permitiu a avaliação da eficiência da vaporização da DMT. A N,N-DMT apresenta potencial farmacológico extenso reportado na literatura, o que incentiva a continuação deste e de outros projetos envolvendo aplicação da molécula. Sob esse viés, é válido ressaltar a necessidade de análises físico-químicas mais detalhadas do produto extraído, em paralelo a procura de metodologias de extração e purificação mais eficientes e com base na química verde.

Outrossim, pode-se sugerir uma investigação da estabilidade da substância isolada em condições de exposição à luz ultravioleta, atmosfera padrão e estabilidade em diferentes solventes. Além disso, é imprescindível que um estudo de sazonalidade da *Mimosa tenuiflora* seja colocado em prática, assim será possível compreender quais são os fatores determinantes

para aumento dos teores de N,N-DMT na planta. Além disso, é viável considerar a domesticação da *Mimosa tenuiflora* a fim de aumentar a produção de N,N-DMT, seja por meio de culturas in vitro ou por meio da aplicação de agentes estressores objetivando estimular a mutação dessa espécie vegetal.

Referências

Fasanello JA, Placke AD. The isolation, identification, and quantitation of dimethyltryptamine (DMT) in *Mimosa hostilis*. *Microgram*. 2007;5:41-52.

Gardner DR, Riet-Correa F, Panter KE. Alkaloid profiles of *Mimosa tenuiflora* and associated methods of analysis. *Poisoning by plants, mycotoxins and related toxins*. 2011:600-5.

Gaujac A, Navickiene S, Collins MI, Brandt SD, de Andrade JB. Analytical techniques for the determination of tryptamines and carboline in plant matrices and in psychoactive beverages consumed during religious ceremonies and neo-shamanic urban practices. *Drug testing and analysis*. 2012 Jul;4(7-8):636-48.

Gaujac A, Dempster N, Navickiene S, Brandt SD, de Andrade JB. Determination of N, N-dimethyltryptamine in beverages consumed in religious practices by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography ion trap mass spectrometry. *Talanta*. 2013 Mar 15;106:394-8.

Gaujac A, Martinez ST, Gomes AA, de Andrade SJ, da Cunha Pinto A, David JM, Navickiene S, de Andrade JB. Application of analytical methods for the structural characterization and purity assessment of N, N-dimethyltryptamine, a potent psychedelic agent isolated from *Mimosa tenuiflora* inner barks. *Microchemical Journal*. 2013 Jul 1;109:78-83.

HAZEKAMP, Arno et al. Evaluation of a vaporizing device (Volcano®) for the pulmonary administration of tetrahydrocannabinol. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 95, n. 6, p. 1308–1317, 2006.

NICASIO, M. D. P. et al. Variation in the accumulation levels of N,N-dimethyltryptamine in micro-propagated trees and in in vitro cultures of *Mimosa tenuiflora*. *Nat Prod Res*, v. 19, n. 1, p. 61-67, 2005.

ROSSI, G. N. et al. Internet method for the extraction of N,N-dimethyltryptamine from *Mimosa hostilis* roots: does it really extract dimethyltryptamine? *J Psychedelic Stud*, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2019.

Anexos

Figura 1 - Curva de calibração de N,N-Dimetiltriptamina

Figura 2 - Perfil de recuperação de DMT de liquid pads

Figura 3 - Avaliação de retenção de DMT em pads após vaporização

Figura 4 - Diagrama de fluxo do DMT após vaporização

CÓDIGO: SB0589

AUTOR: GABRIEL DE FREITAS JANUARIO

ORIENTADOR: DANIEL YASUMASA TAKAHASHI

TÍTULO: Desenvolvimento de pipelines de visão computacional para identificação, rastreamento e classificação de comportamentos sociais de saguis (*Callithrix jacchus*) em ambientes complexos

Resumo

No âmbito deste trabalho de pesquisa, aplicamos tecnologias de visão computacional e redes neurais profundas para analisar os comportamentos sociais dos saguis-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*). O foco é automatizar e modernizar estudos etológicos, tradicionalmente baseados em anotações manuais, por meio do desenvolvimento de ferramentas de visão computacional e redes neurais otimizadas para detectar e rastrear saguis em vídeos. Para isso, iniciamos a etapa de anotação de uma grande quantidade de dados, destinada a alimentar redes neurais capazes de identificar e desenhar a silhueta dos animais em cada frame dos vídeos. Em seguida, treinamos as redes neurais (YOLOv8). Observamos que o nosso modelo alcançou um alto desempenho de acurácia (F1-score médio de 0.9786).

Palavras-chave: Redes. Neurais. Visão. Computacional. Saguis.

TITLE: Development of computer vision pipelines for identification, tracking and classification of social behaviors of marmosets in complex environments

Abstract

As part of this research, we applied computer vision and deep neural networks to analyze the social behaviors of white-tufted marmosets. The focus is to automate and modernize ethological studies, traditionally based on manual annotations, by developing computer vision tools and neural networks optimized for detecting and tracking marmosets in videos. To this end, we began the annotation phase of a large amount of data, intended to feed neural networks capable of identifying and drawing the silhouettes of the animals in each frame of the videos. We then trained these neural networks (YOLOv8). We achieved performance (Average F1-score of 0.9786).

Keywords: Neural. Networks. Computer. Vision. Marmoset.

Introdução

A grande maioria das pesquisas com animais em laboratório possui limitações clássicas: o uso de dispositivos implantados ou marcações nos animais para rastreamento; a dependência de observações visuais manuais; o desconforto que a presença humana causa nos animais durante as observações, podendo chegar a inibir comportamentos naturais; e o esforço humano nas observações e anotações manuais.

Com as tecnologias atuais de visão computacional, é possível detectar, segmentar e anotar seus comportamentos sociais automaticamente com uma melhor precisão e de maneira menos invasiva, mitigando várias das principais limitações nos estudos com animais em cativeiro.

Muitos animais em laboratório são amplamente estudados, com uma vasta literatura etológica. Entretanto, há uma lacuna nos estudos comportamentais de primatas de pequeno porte, a exemplo do Saguí-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*). Devido à semelhança na organização social com os humanos, é de suma importância que essa lacuna de conhecimento seja preenchida.

Nesse sentido, com os constantes avanços das redes neurais profundas e visão computacional, é imprescindível que nossa pesquisa desenvolva ferramentas de visão computacional que possam detectar, segmentar e rastrear automaticamente Saguí-de-tufo-branco em vídeos gravados.

A pesquisa até agora se resumiu ao início do processo de criação de uma pipeline analítica para identificação, rastreamento e classificação de comportamentos sociais de saguis em ambientes complexos. As etapas realizadas: anotação de grande quantidade de dados e treinamento das redes neurais para detecção e rastreamento dos saguis.

Metodologia

Animais

Utilizamos 17 saguí-de-tufos-brancos (*Callithrix jacchus*) em diferentes idades do desenvolvimento, desde bebês a adultos. Os animais têm acesso livre à comida e à água. Todos os procedimentos descritos neste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Protocolo 347.028) e pelo SISBIO (18394), estando em conformidade com as diretrizes nacionais para o uso de animais em pesquisa.

Experimento

Os saguis foram levados inicialmente em gaiolas individualmente para o ambiente de registro. No próprio ambiente de registro, as gaiolas foram aproximadas, permitindo que os saguis se interagissem. Após a observação da interação social afiliativa, retiramos uma das gaiolas vazias e gravamos o comportamento dos animais interagindo.

Anotação de grande quantidade de dados

Os dados utilizados no estudo — vídeos de dois ângulos diferentes (superior e lateral) da gaiola dos saguis — foram disponibilizados por experimentos anteriores realizados no laboratório Ethogenesis Lab (UFRN-ICE). Para uma melhor análise dos comportamentos sociais e para o treinamento de redes neurais, foi necessária uma etapa inicial de processamento dos dados. Focando apenas em trechos de 5 minutos em que dois saguis estavam juntos na mesma gaiola, desenvolveu-se um código em Python, utilizando a biblioteca OpenCV, para processar os vídeos brutos.

Na etapa seguinte, com o uso de uma ferramenta de anotação de bounding boxes (caixas delimitadoras) na plataforma Roboflow (Bounding Box Tool), 4.800 imagens foram

meticulosamente anotadas, contendo as posições e extensões dos retângulos que delimitam os corpos dos saguis. Assim, foi possível treinar uma rede neural capaz de detectar e rastrear saguis em vídeo.

Em um segundo momento da pesquisa, foi utilizada a mesma plataforma Roboflow, mas com uma ferramenta diferente: a Smart Polygon. Em vez de retângulos que indicam posição e extensão, os dados foram anotados com polígonos complexos que circundavam o corpo do sagui, formando uma silhueta. Dessa forma, tornou-se possível o treinamento de uma rede neural para detecção e segmentação dos saguis em vídeo.

Em razão da confidencialidade dos dados do laboratório, não haverá amostra de dados anotados neste trabalho.

Treinamento das redes neurais para detecção e rastreamento dos saguis

Com a base de dados confiável e completamente anotada, foi possível iniciar a etapa de treinamento das redes neurais.

No primeiro momento da pesquisa, o objetivo foi desenvolver duas redes neurais de detecção de objetos (neste caso, animais), uma para cada câmera (visão superior e visão lateral). Para isso, a rede neural — modelo YOLOv8n da biblioteca ultralytics — da câmera superior foi treinada com 2.250 imagens anotadas e a da câmera lateral com 2.550 imagens, em ambos os casos com conjuntos de dados divididos em 75% para treinamento e 25% para validação. Para o propósito de detecção e rastreamento, as redes neurais de cada câmera mostraram-se eficientes.

No segundo momento, o objetivo foi medir a distância entre os dois saguis em cada frame, a fim de coletar informações relevantes acerca dos seus comportamentos sociais — por exemplo, verificar se o filhote permanecia majoritariamente mais próximo da mãe do que junto ao pai. Nesse sentido, a detecção por bounding boxes mostrou-se falha, já que não era possível calcular com precisão a distância entre os saguis: as caixas delimitadoras podiam estar colidindo, sem que necessariamente houvesse contato entre os animais. Para resolver essa questão, treinamos uma rede neural de segmentação por instância — modelo YOLOv8n-seg da biblioteca ultralytics — com 2.250 imagens da câmera superior, que além de detectar os saguis, cria uma silhueta delimitando seus corpos. A segmentação mostrou-se bastante útil, pois possibilitou determinar com maior precisão o contato entre os saguis e suas distâncias reais.

Resultados e Discussões

Para embasar a hipótese de que as redes neurais foram eficientes e capazes de detectar os saguis e realizar sua segmentação, foram calculadas métricas de desempenho ao final de cada treinamento das três redes neurais (duas de detecção e uma de segmentação), utilizando o conjunto de validação dos respectivos conjuntos de dados empregados no treinamento.

Rede Neural Detecção — Câmera Superior:

- Precision: 0.98653
- Recall: 0.97835

- mAP@50: 0.98836
- mAP@50-95: 0.86775

Rede Neural Detecção — Câmera Lateral:

- Precision: 0.98378
- Recall: 0.97647
- mAP@50: 0.99377
- mAP@50-95: 0.88656

Rede Neural Segmentação — Câmera Superior:

Para Bounding boxes:

- Precision: 0.97894
- Recall: 0.97779
- mAP@50: 0.99334
- mAP@50-95: 0.87931

Para Segmentação:

- Precision: 0.97416
- Recall: 0.97301
- mAP@50: 0.99095
- mAP@50-95: 0.79823

As métricas revelam a eficiência e a precisão alcançadas por cada rede neural, evidenciando o sucesso do treinamento e confirmando que as tecnologias de visão computacional são ferramentas valiosas para a detecção e segmentação de saguis. Esses resultados abrem novos caminhos para a modernização das pesquisas com animais em cativeiro.

Conclusão

As redes neurais profundas treinadas neste trabalho mostraram-se bastante úteis e precisas, possibilitando o avanço da pesquisa na análise dos comportamentos sociais de saguis-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) e, conseqüentemente, contribuindo futuramente para o preenchimento da lacuna de conhecimento nos estudos etológicos de primatas de pequeno porte. Assim, confirma-se que a abordagem emergente do uso de inteligência artificial possui enorme potencial inovador em diversos estudos sobre animais.

Futuramente, esperamos concluir a pipeline de visão computacional para identificação, rastreamento e classificação de comportamentos sociais de saguis em ambientes complexos. Para isso, a próxima etapa será treinar uma segunda rede neural de segmentação, referente à

câmera lateral, que permitirá o desenvolvimento de um filtro espaço-temporal capaz de medir a distância e/ou indicar o contato entre os saguis. Dessa forma, uma grande quantidade de informações poderá ser inferida sobre seus comportamentos sociais, incluindo aspectos da relação parental entre os indivíduos. Em uma etapa seguinte, utilizaremos novamente o YOLOv8 para classificar comportamentos de catação observados nos saguis, com o mesmo enfoque de extrair informações relevantes acerca dessas interações sociais.

Referências

Livros

GOODFELLOW, Ian; BENGIO, Yoshua; COURVILLE, Aaron. Deep Learning. Cambridge: MIT Press, 2016.

Artigos

KANEKO, Takaaki. et al. Deciphering social traits and pathophysiological conditions from natural behaviors in common marmosets. *Current Biology*, v. 34, p. 2854–2867, 8 jul. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2024.05.033>

YURIMOTO, Terumi. et al. Development of a 3D tracking system for multiple marmosets under free-moving conditions. *Communications Biology*, v. 7, n. 216, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-024-05864-9>

Sites

OPENCV. Open Source Computer Vision Library. Disponível em: <https://opencv.org>. Acesso em: 27 ago. 2025.

ULTRALYTICS. Ultralytics YOLO. Disponível em: <https://www.ultralytics.com>. Acesso em: 27 ago. 2025.

PYTHON SOFTWARE FOUNDATION. Python programming language. Disponível em: <https://www.python.org>. Acesso em: 27 ago. 2025.

ROBOFLOW. Roboflow: computer vision tools. Disponível em: <https://roboflow.com>. Acesso em: 27 ago. 2025.

CÓDIGO: SB0593

AUTOR: THIAGO GUIMARAES SILVA

ORIENTADOR: EMELIE KATARINA SVAHN LEAO

TÍTULO: Aprimorando sistema de detecção de sobressalto acústico para teste de zumbido/tinnitus em roedores

Resumo

Este projeto tem como objetivo aprimorar a metodologia *Gap Prepulse Inhibition of the Acoustic Startle* (GPIAS) para o estudo do zumbido em modelos animais, por meio do desenvolvimento de soluções tecnológicas e metodológicas que aumentem a precisão e a confiabilidade de detecção de supressão do reflexo de sobressalto acústico. Para isso, estão sendo integrados precisos sensores célula de carga, conversores analógico- digital (ADC) de alta resolução, microcontroladores ESP32 com firmware dedicado e softwares em Python capazes de executar estímulos auditivos, captar e analisar em tempo real os dados obtidos dos experimentos. Também desenvolvemos protótipos de cilindros de contenção em impressora 3D, atualmente em fase de testes, além da implementação de um ambiente experimental controlado com isolamento acústico em sala e em caixa de madeira com alto-falante embutido.

O protocolo prevê ainda a habituação cuidadosa dos camundongos, como testes auditivos prévios para garantir a integridade da audição antes da participação nos experimentos. Apesar dos avanços propostos, o projeto enfrenta limitações importantes, como a variabilidade natural do comportamento individual dos animais, afetando a intensidade do reflexo de sobressalto, gerando uma necessidade de calibração rigorosa dos equipamentos e aperfeiçoamento dos sistemas de análises dos dados. Desta forma, a pesquisa busca inovar o teste GPIAS, e contribuir para maior confiabilidade nos estudos experimentais sobre o zumbido.

Palavras-chave: Tinnitus. Zumbido. Sistema Auditivo. GPIAS. Saude. Tecnologia.

TITLE: Improving acoustic startle detection system for tinnitus testing in rodents

Abstract

This project aims to improve the Gap Prepulse Inhibition of the Acoustic Startle (GPIAS) methodology for studying tinnitus in animal models by developing technological and methodological solutions that increase the accuracy and reliability of results. To this end, we integrated precise load cell sensors, high-precision analog-digital converters (ADC), ESP32 microcontrollers with dedicated firmware, and Python software capable of executing auditory stimuli and capturing and analyzing the data obtained during the experiments in real time.

Prototypes of containment cylinders were also developed using a 3D printer and are currently undergoing testing. A controlled experimental environment with acoustic isolation in a room and a wooden box with a built-in speaker was also implemented.

The protocol also includes careful habituation of the mice, as well as auditory tests to ensure hearing integrity prior to participation in the experiments. Despite the proposed advances, the project has significant limitations, such as the natural variability of animal behaviour (restless, sleep, relaxed, curiosity) influencing the startle reflex magnitude, the need for rigorous equipment flexibility, the elimination of unwanted acoustic and electronic noise, and improved data analysis systems. Thus, this research offers an innovative approach to improve the GPIAS apparatus, contributing to greater reliability in experimental tinnitus studies.

Keywords: Tinnitus. Auditory System. GPIAS. Health. Technology.

Introdução

Um dos maiores desafios no estudo do zumbido (em Inglês *tinnitus*) é a dificuldade inerente em modelos animais de sinalizar a percepção de um som fantasma. Para superar essa barreira, diversas abordagens comportamentais foram desenvolvidas para um animal sinalizar percepção de um som, ou nesse caso, zumbido sem fonte externa. Por exemplo, existem testes baseados em lambes água ao ouvir um som específico ou o treinamento para entrar em uma câmara específica em resposta a um estímulo auditivo. No entanto, esses métodos tradicionais são frequentemente demorados, exigem extenso treinamento do animal, e podem gerar falsos positivos (Longenecker et al., 2018). A pesquisa sobre o zumbido tem avançado significativamente com a introdução de uma metodologia mais eficiente para a triagem e avaliação do zumbido em modelos animais: a Inibição do Reflexo de Sobressalto Acústico por falta de Pré-pulso (momento silencioso) (em Inglês *Gap prepulse inhibition of acoustic startle* - GPIAS, Turner et al., 2006).

Diferente das técnicas anteriores que dependiam de condicionamento, o GPIAS não exige treinamento animal prévio e permite a avaliação do zumbido em uma única e curta sessão de teste (Longenecker and Galazyuk, 2012). O método baseia-se na avaliação da capacidade de detecção de lacunas em um som de fundo contínuo semelhante ao tinnitus. A ideia central da técnica é, antes de um alto estímulo de sobressalto, a detecção de uma breve lacuna silenciosa inibe o reflexo de sobressalto acústico (em Inglês *auditory startle reflex* - ASR). Em animais com zumbido, espera-se que essa capacidade de detecção de lacunas seja prejudicada – ou seja, haverá uma falta de inibição do ASR – caso o som de fundo que contém a lacuna seja qualitativamente semelhante à frequência do zumbido, pois o zumbido efetivamente "preencheria" a lacuna, mascarando-a (Lobarinas et al., 2013).

Apesar de seu uso crescente, torna-se evidente a necessidade de aprimorar tanto o equipamento de GPIAS quanto os testes de audição aplicados em animais (Longenecker and Galazyuk, 2012). Um grande esforço está sendo focado na aprimoração de análise estatística (Schilling et al., 2017) e na implementação de análise por vídeo de alta precisão (Wallace et al., 2024). Em muitos casos, a limitação não está apenas no paradigma experimental, mas na precisão e na sensibilidade dos dispositivos empregados (Longenecker and Galazyuk, 2012; Wallace et al., 2024). Equipamentos que não conseguem captar de forma consistente as variações no reflexo de sobressalto como antigos piezoelétricos, acelerômetros, conversores

ADC com baixa resolução, e ambientes que não estejam livres de ruídos acústicos e eletrônicos podem comprometer a confiabilidade dos resultados. Isso leva a dificuldades na diferenciação entre alterações genuínas na percepção auditiva e falhas técnicas de detecção do sobressalto, podendo gerar exclusões indevidas de animais ou interpretações equivocadas sobre a presença de zumbido.

Neste cenário, é importante que sejam realizadas melhorias precisas nos set-ups dos experimentos, com modelos diferentes de sensores capazes de capturar pequenos sinais mecânicos (preferencialmente somente num eixo, como força gravitacional), e que se adaptem melhor ao comportamento de sobressalto pelo reflexo acústico. Além de sistemas digitais capazes de processar esses dados com extrema precisão e operar em sincronia com os protocolos de estímulo auditivo, alinhando precisamente os registros com os momentos críticos dos estímulos auditivos.

Essa uniformidade pode contribuir para a detecção do real efeito do zumbido, permitindo uma maior comparabilidade entre estudos. Avanços no desenvolvimento de equipamentos mais robustos, com maior sensibilidade e menor suscetibilidade a ruídos experimentais, bem como o refinamento dos protocolos de teste auditivo, são fundamentais para aumentar a precisão diagnóstica e fortalecer o papel do GPIAS como ferramenta confiável na pesquisa em neurociência auditiva.

Metodologia

Animais:

Antes da realização dos experimentos, é fundamental garantir a adequada habituação dos camundongos ao ambiente de teste. Esse processo deve ser conduzido de forma gradual e cuidadosa, visando reduzir o estresse dos animais e assegurar que as respostas registradas reflitam efetivamente sua percepção auditiva, e não reações decorrentes da ansiedade ou da novidade do contexto experimental. Durante a habituação, os animais são expostos ao ambiente e ao equipamento em períodos controlados, permitindo que se familiarizem com os estímulos presentes sem a aplicação imediata de protocolos de teste.

Outro aspecto essencial é o respeito ao ciclo circadiano dos camundongos, uma vez que a atividade e a reatividade desses animais variam ao longo do dia. Realizar os testes em horários compatíveis com o seu ritmo biológico contribui para a padronização dos resultados e reduz a variabilidade associada a fatores comportamentais externos.

Além disso, a função normal do sistema auditivo dos camundongos deve sempre ser avaliada antes do início dos experimentos. Testes de audição são fundamentais para confirmar que os animais apresentam audição íntegra e estão aptos a participar dos estudos. Essa etapa já está estabelecida no laboratório (Malfatti et al., 2022; Ciralli et al., 2023).

Nesse projeto de Iniciação Científica focamos na inovação de hardware e software. Assim, a combinação de habituação cuidadosa, respeito aos ciclos biológicos e avaliação criteriosa da audição representa um alicerce essencial para a obtenção de resultados consistentes e cientificamente válidos nas pesquisas envolvendo GPIAS e modelos animais de zumbido, garantindo uma confiabilidade nas melhorias aplicadas ao equipamento.

Hardware:

Foi desenvolvido um cilindro para conter os animais prototipado pelo software ONSHAPE, utilizado para desenhos técnicos e modelagem 3D. Imprimimos os cilindros utilizando a impressora 3D (ANYCUBIC), com o material PLA na cor azul. O Cilindro foi acoplado mecanicamente de forma adequada a sensores células de carga de 100g, conectados a conversores analógicos-digitais HX711, onde é realizado a amplificação de 22 vezes o sinal e a conversão dos sinais analógicos para protocolos I2C digitais. Utilizamos cabos do tipo jumper, conectados a uma matriz de contato desenvolvida especificamente para os microcontroladores ESP-32S da NodeMCU, onde é feita a comunicação entre o microcontrolador e o conversor ADC. Também foram desenvolvidos firmwares dedicados para o ESP32 utilizando a linguagem de programação C++, através do programa ARDUINO IDE que também foi utilizado para compilar os scripts ao microcontrolador.

Software:

Complementarmente, foi desenvolvido um software em Python dedicado à recepção e análise desses dados. A aplicação estabelece comunicação direta com o ESP32, realizando a coleta em tempo real e armazenando os registros em formato padronizado para posterior processamento. Ferramentas de análise de dados foram incorporadas ao software, permitindo identificar automaticamente os principais momentos de variação nos sinais provenientes das células de carga. Essa etapa não apenas facilita a detecção de padrões relevantes para os experimentos, como também reduz o tempo de interpretação manual e a suscetibilidade a erros subjetivos. Dessa forma, a integração entre hardware especializado e software analítico oferece uma solução completa, capaz de aumentar significativamente a precisão, a confiabilidade e a escalabilidade das medições nos estudos de audição animal e pesquisa em zumbido.

Resultados e Discussões

O presente projeto tem como objetivo aprimorar a metodologia de *Gap Prepulse Inhibition of the Acoustic Startle*(GPIAS), empregada na investigação do zumbido em modelos animais. O GPIAS é amplamente utilizado por permitir a avaliação indireta da percepção auditiva a partir da inibição do reflexo de sobressalto, mas sua confiabilidade ainda enfrenta questionamentos (Lobarinas et al., 2013). Em vez de focar no avanço da análise e/ou estatística, buscamos desenvolver um sistema simples embora mais sensível, preciso e padronizado, que garanta maior robustez na aquisição e análise de dados.

Um protótipo de cilindro foi desenvolvido através de software de modelagem 3D para acomodar os camundongos durante os experimentos (**Figura 1**), garantindo posicionamento em quatro patas, sem espaço para o animal caminhar, ainda mantendo o conforto e sem comprometer a coleta dos dados. O protótipo inicial foi impresso em impressora 3D (**Figura 2A-B**), permitindo testar diferentes dimensões e formatos até alcançar o design ideal, avaliando tanto a ergonomia quanto a compatibilidade com os equipamentos de registro.

Após a validação do modelo, o cilindro será produzido em material mais durável, como acrílico, apropriado para o ambiente laboratorial, priorizando superfícies lisas e resistentes a agentes de limpeza e desinfecção. Essa transição garantirá maior biossegurança, facilidade de higienização e longevidade do dispositivo, tornando-o adequado para o uso contínuo em pesquisas de audição com modelos animais.

No intuito de superar limitações existentes e aprimorar a qualidade das medições no paradigma GPIAS, propomos a incrementação de um sistema baseado em sensores de célula de carga de alta precisão (100g), integrados a conversores analógicos-digitais (HX711) de elevada resolução e taxa de amostragem (**Figura 2C**). Estes sensores permitem a detecção extremamente sensível de variações mínimas na resposta física do animal, garantindo maior robustez e confiabilidade nos registros. Para o processamento local, são empregados microcontroladores ESP32, capazes de aliar baixo consumo energético, conectividade sem fio e suporte a protocolos de comunicação de alta velocidade, assegurando o envio contínuo dos dados em tempo real. O desenvolvimento de firmware específico para o ESP32 possibilita o controle preciso da aquisição, filtragem preliminar de ruídos e transmissão eficiente dos sinais coletados (**Figura 2**).

Além disso, o equipamento GPIAS será instalado dentro de uma caixa de madeira desenvolvida especialmente para o experimento (**Figura 2D**). A estrutura contará com isolamento acústico adicional por meio de revestimento interno em espuma (**Figura 2D**), o que reforça a proteção contra ruídos indesejados e proporciona maior controle sobre os estímulos apresentados. No teto da caixa está embutido um alto-falante, estrategicamente posicionado para oferecer uma distribuição uniforme do som no interior, garantindo a padronização dos testes e a confiabilidade dos resultados obtidos (**Figura 2E**).

Testes preliminares

Para validar o modelo experimental do GPIAS, realizamos um teste piloto com camundongo (**Figura 3**). Os principais objetivos deste teste foram:

Avaliar a qualidade ergonômica do cilindro de acomodação para o animal

Embora modelos semelhantes de cilindros já sejam utilizados em outros experimentos, validar a eficiência do dispositivo desenvolvido foi uma etapa essencial. Neste teste, analisamos o conforto do animal e a necessidade de limitar seus movimentos (**Figura 3A**). O resultado foi satisfatório: o cilindro acomodou o camundongo de forma eficiente, permitindo movimentos simples, como virar de um lado para o outro, mas restringindo a caminhada para evitar sobrecarga de dados durante a análise.

Analisar a eficiência do sensor de célula de carga

A substituição do tipo e modelo de sensor utilizado no GPIAS, juntamente com a adoção de um módulo ADC (analógico-digital), foi uma modificação relevante no equipamento. Avaliamos sua eficiência na captação de pequenas variações motoras dos roedores (**Figura 3C-D**). O sistema apresentou resultados surpreendentes, demonstrando alta sensibilidade aos movimentos do camundongo e significativa resistência a ruídos externos, evidenciando a robustez da aquisição de dados pelo hardware.

Captar o sinal do reflexo de sobressalto acústico com o sistema proposto

Também testamos a eficiência do hardware em conjunto com o software desenvolvido para a captura do reflexo de sobressalto acústico. Esta etapa foi fundamental, uma vez que um dos objetivos centrais do trabalho é identificar e distinguir esse reflexo com maior precisão. Não aplicamos ainda o protocolo completo do GPIAS, mas buscamos avaliar o sinal bruto do reflexo, bem como a sensibilidade e eficiência do modelo.

Para tal, instalamos o equipamento no ambiente real dos futuros experimentos (**Figura 3B**). Emitimos em momentos aleatórios sons pelos alto-falantes, semelhantes aos utilizados nos

testes GPIAS, registrando os momentos exatos da emissão em sincronia com o sinal adquirido em tempo real (**Figura 3C-D**).

Observamos um padrão consistente nos sinais associados ao reflexo de sobressalto, que ainda necessita de validação em experimentos posteriores. A análise revelou, no momento do reflexo, um pico positivo de grande amplitude seguido de um pico negativo (**Figura 3C**), e posteriormente uma rampa decrescente que estabiliza brevemente (**Figura 3D**). Esse período de imobilidade pode indicar um pequeno comportamento de *freezing* após o reflexo, sugerindo um possível modelo inicial para quantificação dos sinais.

Reforçamos a importância da realização de novos testes, com maior número de animais e sessões experimentais, a fim de compreender melhor os padrões do reflexo de sobressalto e calibrar adequadamente um software capaz de analisar os resultados com precisão.

Limitações e dificuldades do projeto

Apesar dos avanços planejados, o projeto enfrenta desafios importantes. O próprio paradigma GPIAS apresenta limitações, como a dependência de um reflexo de sobressalto robusto para permitir medições confiáveis. Em animais com perda auditiva ou com reflexo naturalmente reduzido, pode haver dificuldades na interpretação dos dados, levando a exclusões indevidas ou até a falsos positivos. Outro ponto é a variabilidade do reflexo de sobressalto, que pode ser influenciada por fatores como intervalos entre tentativas, adaptação sensorial, exigindo análises estatísticas rigorosas para distinguir entre perda real de detecção de lacunas e simples alterações na reatividade do animal.

Do ponto de vista técnico, ainda existem desafios relacionados à precisão dos equipamentos e à padronização dos testes auditivos. Os protótipos de cilindros precisam passar por ajustes para equilibrar contenção adequada e bem-estar dos animais, enquanto a escolha do material final deve atender simultaneamente aos critérios de durabilidade, biossegurança e facilidade de higienização. O sistema de aquisição de dados, embora promissor, requer calibração cuidadosa dos sensores de carga, dos conversores e da comunicação com o ESP32, além de validação do software em Python para garantir que os algoritmos de detecção não introduzem vieses.

Realizamos testes iniciais utilizando diferentes formatos de recipientes para acomodação do animal. Primeiramente, testamos um recipiente acrílico de formato retangular, habitualmente usado em outros tipos de experimentos. Contudo, por ser muito espaçoso, ele permitia grande movimentação do animal, o que poderia dificultar a filtragem dos sinais que de fato representavam um reflexo de sobressalto. Diante desse desafio, passamos a desenvolver novos modelos de recipientes em impressora 3D, optando por um formato cilíndrico e de tamanho reduzido, que se mostrou mais adequado por limitar a quantidade de movimentos realizados pelos animais.

Outro desafio importante esteve relacionado ao hardware: a escolha de um sensor ideal para captar o reflexo de sobressalto, bem como o desenvolvimento de um sistema mecânico para acoplá-lo ao cilindro. Os sensores do tipo célula de carga, apesar de sua alta precisão, exigem uma montagem mecânica específica para evitar efeitos indesejáveis, como alavancagem e amortecimento do sinal.

Além disso, a seleção do conversor ADC também foi um ponto crítico. Atualmente utilizamos os conversores HX711, que apresentam boa resolução, mas uma taxa de amostragem ainda limitada. Futuramente, pretendemos testar o ADS1230, que também oferece alta resolução e uma taxa de amostragem superior. No entanto, trata-se de um componente de difícil acesso no mercado brasileiro de eletrônicos.

Em resumo, a pesquisa se propõe a superar fragilidades metodológicas e técnicas do GPIAS por meio de inovações em hardware, software e protocolos experimentais, mas enfrenta limitações relacionadas à variabilidade biológica dos animais, precisão dos dispositivos e à padronização do ambiente de teste.

Conclusão

O equipamento experimental contempla pesquisa que combina inovação tecnológica, cuidado metodológico e respeito ao bem-estar animal, buscando aumentar a confiabilidade dos resultados na investigação do zumbido. Com esse avanço, buscamos contribuir para os modelos experimentais equipados com GPIAS, amplamente utilizados em diversos laboratórios ao redor do mundo, fortalecendo pesquisas que visam a uma compreensão mais profunda do sistema auditivo e, em especial, dos mecanismos relacionados ao tinnitus.

Os testes práticos realizados demonstraram a aplicabilidade do sistema desenvolvido e reforçaram sua robustez tanto na ergonomia do cilindro de acomodação quanto na sensibilidade do sensor e na captura dos sinais do reflexo de sobressalto acústico. Embora preliminares, esses resultados evidenciam o potencial do equipamento em oferecer dados consistentes, ao mesmo tempo em que preserva o bem-estar animal e reduz interferências externas.

O desenvolvimento tecnológico e metodológico do sistema GPIAS representa um potencial de avanço importante, ao proporcionar maior uniformidade e confiabilidade na detecção do tinnitus em roedores. Essa melhoria pode impactar positivamente um grande número de estudos, reduzindo inconsistências e aumentando o aproveitamento dos esforços de pesquisa. Dessa forma, espera-se oferecer aos profissionais maior segurança na aquisição e análise dos dados, favorecendo diagnósticos mais precisos e consistentes.

Referências

Ciralli B, Malfatti T, Lima TZ, Silva SRB, Cederroth CR, Leao KE (2023) Alterations of auditory sensory gating in mice with noise-induced tinnitus treated with nicotine and cannabis extract. *J Psychopharmacol (Oxf)* 37:1116–1131.

Lobarinas E, Hayes SH, Allman BL (2013) The gap-startle paradigm for tinnitus screening in animal models: Limitations and optimization. *Hear Res* 295:150–160.

Longenecker RJ, Galazyuk AV (2012) Methodological optimization of tinnitus assessment using prepulse inhibition of the acoustic startle reflex. *Brain Res* 1485:54–62.

Longenecker RJ, Kristaponyte I, Nelson GL, Young JW, Galazyuk AV (2018) Addressing variability in the acoustic startle reflex for accurate gap detection assessment. *Hear Res* 363:119–135.

Malfatti T, Ciralli B, Hilscher MM, Leao RN, Leao KE (2022) Decreasing dorsal cochlear nucleus activity ameliorates noise-induced tinnitus perception in mice. *BMC Biol* 20:102.

Schilling A, Krauss P, Gerum R, Metzner C, Tziridis K, Schulze H (2017) A New Statistical Approach for the Evaluation of Gap-prepulse Inhibition of the Acoustic Startle Reflex (GPIAS) for Tinnitus Assessment. *Front Behav Neurosci* 11 Available at: <https://www.frontiersin.org/journals/behavioral-neuroscience/articles/10.3389/fnbeh.2017.00198/full> [Accessed July 31, 2025].

Turner JG, Brozoski TJ, Bauer CA, Parrish JL, Myers K, Hughes LF, Caspary DM (2006) Gap detection deficits in rats with tinnitus: a potential novel screening tool. *Behav Neurosci* 120:188–195.

Wallace MN, Berger JJ, Hockley A, Sumner CJ, Akeroyd MA, Palmer AR, McNaughton PA (2024) Identifying tinnitus in mice by tracking the motion of body markers in response to an acoustic startle. *Front Neurosci* 18 Available at: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2024.1452450/full> [Accessed August 29, 2025].

Anexos

Figura 1

Figura 2

Figura 3

Figura 4

Anexo I

CÓDIGO: SB0624

AUTOR: LÍVIA MARIA CARNEIRO SOARES

COAUTOR: RAQUEL LÚCIA SOUTO DE ARAÚJO

COAUTOR: THAIS PRISCILA LIMA SILVA

COAUTOR: JANINE INEZ ROSSATO

COAUTOR: JOHSEPH PABALLO GOMES DE SOUZA

ORIENTADOR: MARTIN PABLO CAMMAROTA

TÍTULO: Caracterização eletrofisiológica do processo de extinção

Resumo

O aprendizado de extinção permite que respostas comportamentais previamente adquiridas, como o medo, sejam ajustadas frente a mudanças no ambiente. No condicionamento pavloviano, um estímulo inicialmente neutro, ao ser pareado com um estímulo aversivo, passa a provocar resposta de medo. A extinção, dependente de erro de previsão, não elimina a memória original, mas estabelece um novo aprendizado inibitório. A tarefa de esquiva inibitória foi utilizada como modelo para estudar a memória aversiva em roedores, onde o tempo de descida da plataforma para a grade foi avaliado ao longo das sessões, que são realizadas na ausência de choque. Ratos Wistar machos com implantes de microeletrodos no hipocampo para registro da atividade elétrica cerebral foram submetidos à tarefa. Nossos dados indicam que a memória de medo pode ser extinta em uma única sessão e que a descida da plataforma no momento da extinção é acompanhada por um aumento do acoplamento de oscilações teta e de alta frequência. Nossos achados destacam esse acoplamento como possível biomarcador eletrofisiológico da extinção.

Palavras-chave: Extinção. Acoplamento teta-alta frequência. Hipocampo.

TITLE: Electrophysiological characterization of the extinction process

Abstract

Extinction learning allows previously acquired behavioral responses, such as fear, to be adjusted in the face of environmental changes. In Pavlovian conditioning, an initially neutral stimulus, when paired with an aversive stimulus, comes to elicit a fear response. Extinction, which depends on prediction error, does not erase the original memory but instead establishes a new inhibitory learning. The inhibitory avoidance task was used as a model to study aversive memory in rodents, in which the latency to step down from the platform to the grid was evaluated across sessions performed in the absence of shock. Male Wistar rats with hippocampal microelectrode implants for recording brain electrical activity were subjected to the task. Our data indicate that fear memory can be extinguished in a single session and that stepping down from the platform at the moment of extinction is accompanied by an increase in theta-high-frequency coupling. Our findings highlight this coupling as a potential electrophysiological biomarker of extinction.

Keywords: Extinction. Theta–high-frequency coupling. Hippocampus.

Introdução

O medo é uma das respostas de sobrevivência mais importantes para os seres vivos. Por isso, formas de aprendizagem baseadas no medo têm sido amplamente investigadas, trazendo avanços significativos para a neurobiologia do aprendizado e da memória (IZQUIERDO et al., 2016). Em animais, o aprendizado pavloviano e o instrumental são amplamente usados para estudar o medo. No condicionamento pavloviano, um estímulo condicionado (CS), inicialmente neutro (como um som), é apresentado junto a um estímulo incondicionado (US), como um choque elétrico. Após a associação CS–US, o som passa a evocar uma resposta condicionada de medo (PAVLOV, 1927; DVIR et al., 2019). A resposta de medo é alterada pela ausência de reforço, ou seja choque. A resposta de medo diminui, o que caracteriza a extinção. A extinção é crucial para permitir que comportamentos aprendidos se ajustem a novos contextos (IZQUIERDO et al., 2006). Embora pareça apagar o aprendizado anterior, a extinção trata-se de um novo aprendizado que inibe a resposta prévia (RESCORLA, 2001; BOUTON, 2017).

Evidências mostram que o aprendizado original (pavloviano) gera a resposta, enquanto que o da extinção inibe a resposta. Para que a extinção ocorra, é necessário um erro de previsão: no contexto de extinção, a ausência ou redução do US em relação ao esperado promove a inibição da resposta. (BOUTON et al., 2020; RESCORLA, 2006). Segundo Rescorla (2001), aumentar a discrepância entre expectativa e realidade pode fortalecer o aprendizado da extinção.

A tarefa de esquiva inibitória (EI) é amplamente utilizada para investigar o aprendizado aversivo (IZQUIERDO et al., 2016), baseando-se na tendência exploratória de roedores diante de novos ambientes (JABLONSKI et al., 2013). No treino, o animal é colocado em uma caixa e recebe choque nas patas ao descer de uma plataforma; no teste, avalia-se o tempo que permanece na plataforma (CAMMAROTA et al., 2003). Altas latências indicam boa retenção, e baixas, pouca retenção ou amnésia (GOLD, 1986). Testes repetidos sem choque levam à extinção da resposta (VIANNA et al., 2001).

A EI envolve aprendizado pavloviano, em que o choque (US) e o contexto (CS) são pareados, evocando resposta aversiva no teste. Durante o teste, podem ocorrer comportamentos como congelamento, alongamento, grooming, rearing e avaliação de risco (GOLD, 1986). A EI é uma tarefa dependente de hipocampo, onde os indivíduos aprendem em uma única sessão de treino, isso permite investigar as diferentes fases do processamento mnemônico associado a ela (ABEL; LATTAL, 2001; MCGAUGH; SHAW, 1990).

A atividade oscilatória cerebral também influencia a recuperação de memórias de extinção, coordenando interações entre regiões cerebrais durante tarefas cognitivas e comportamentais (FRIES, 2015). Várias regiões encefálicas participam do do aprendizado de extinção, de particular importância, o hipocampo. A literatura sugere, que no hipocampo há aumento do acoplamento teta–gama (RADISKE et al., 2020; TORT et al., 2009), além de maior sincronia entre hipocampo e outras estruturas. Esses achados indicam papel crítico das oscilações regiões encefálicas, particularmente envolvendo o hipocampo, embora ainda não haja definição de uma assinatura eletrofisiológica específica para a extinção da memória de evitamento.

Metodologia

Sujeitos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade, pesando entre 300 e 350 g. Os animais foram mantidos em caixas-moradia individualmente após a cirurgia, com temperatura e umidade controladas, água e comida ad libitum, e sob um ciclo claro/escuro de 12 horas. Os experimentos foram realizados durante o período claro do ciclo e todos os procedimentos estiveram de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para o implante de uma matriz de microeletrodos de 32 canais sem cânulas-guia, para aquisição do sinal eletrofisiológico. Para a confecção, foram utilizados fios de tungstênio de 30 μm e cânulas de aço inoxidável de 0,2 mm de calibre, conforme descrito por Rossato et al. 2019 e Ramanathan et al. 2018.

Para o implante da matriz, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica nas seguintes coordenadas: CA1 do hipocampo: AP -4,2 mm, ML $\pm$ 2,4 mm, DV -3,0 mm; Paxinos e Watson, 2006.

Tarefa comportamental

Foi utilizada a tarefa de esquiva inibitória (step-down). O aparato consiste em uma caixa metálica (50 $\times$ 25 $\times$ 25 cm) com piso composto por barras de bronze (1 mm de diâmetro, espaçadas em 1 cm) e uma plataforma de madeira (7 $\times$ 25 cm) em uma das extremidades.

- Treino: o animal foi colocado na plataforma, voltado para a parede oposta à grade. Ao descer e tocar a grade com as quatro patas, recebia um choque elétrico (0,4 mA por 2 s), sendo imediatamente retirado e devolvido à gaiola moradia.
- Extinção (24h após o treino): os animais foram novamente colocados na plataforma e foi avaliado o tempo de latência para descer da mesma (máx. 600 s). Quando o animal descia, iniciava-se a sessão de extinção, na qual o animal podia explorar livremente aparato por 300 s sem receber choque.
- Teste (48h após o treino): os animais foram novamente colocados sobre a plataforma e foi avaliado o tempo de descida para a grade. Assim que o animal descia da plataforma ele era retirado do aparato comportamental.

Na figura 1 pode-se observar o desenho do protocolo experimental.

Eletrofisiologia

A atividade elétrica encefálica foi registrada utilizando o sistema de aquisição de dados CerePlex Direct (Blackrock Microsystems LCC, Utah, EUA). Os sinais das single-units

foram amplificados ($\times 10.000$), digitalizados (30 kHz) e armazenados em um computador para análise posterior. Os sinais LFP (local field potential) foram adquiridos na frequência de amostragem de 30 kHz e filtrados com passa-banda entre 0,3 e 500 Hz.

Análise dos dados

A análise dos dados coletados foi realizada com rotinas personalizadas escritas em Python. Foi utilizado o método do periodograma de Welch (com janelas de Hamming de 3 s e sobreposição de 75%) para computação de espectros de potência, filtrados nas bandas teta (5–10 Hz), beta (12–30 Hz) e gama (30–80 Hz) e armazenados para análises posteriores. Para avaliar as oscilações nas bandas de frequência analisadas durante a tarefa EI, as sessões de teste e extinção tiveram sua potência normalizada utilizando os dados de uma sessão basal de cada sujeito.

Resultados e Discussões

O aprendizado de extinção permite que respostas comportamentais previamente adquiridas, como o medo, sejam ajustadas frente a mudanças no ambiente. No condicionamento pavloviano, um estímulo inicialmente neutro, ao ser pareado com um estímulo aversivo, passa a provocar resposta de medo. A extinção, dependente de erro de previsão, não elimina a memória original, mas estabelece um novo aprendizado inibitório.

A tarefa de esquia inibitória é um modelo amplamente utilizado para estudar memória de medo em roedores. Nela a inferência da memória é feita nas sessões de teste pela mensuração do tempo que os animais passam sobre a plataforma antes de descender para a grade. Repetidos testes sem punição levam à extinção da resposta aversiva. Neste estudo, ratos Wistar machos receberam implantes de microeletrodos no hipocampo para registro da atividade elétrica cerebral. Após a recuperação, os animais foram treinados na esquia inibitória e passaram pelo protocolo de extinção descrito previamente e foram testados. As oscilações hipocámpais foram registradas ao longo da sessão de extinção e na sessão de teste.

Para testar o protocolo de extinção, os animais foram treinados com um choque elétrico de 0,4 mA. Um grupo foi submetido ao protocolo de extinção, enquanto o outro permaneceu em suas caixas-moradia. Os animais foram testados 24 h ou 48 h após o treino, e a latência para descer da plataforma foi registrada. Os dados da figura 2 são apresentados como mediana e intervalo interquartil; $n = 8$ –11 animais por grupo. Nossos resultados mostram que a extinção ocorre em uma única sessão comportamental. No dia do teste, os animais foram divididos em dois grupos, um que não passou pela extinção (barras cinzas) e um que passou pela extinção (barras vermelhas). A memória de extinção é evidenciada em um teste 48 h após o treino.

- **Treino $\times$ Teste 48h (Sem Extinção)** – aumento significativo da latência no grupo sem extinção (Wilcoxon pareado, $p = 0,0078$), confirmando aquisição da memória aversiva.
- **Teste 48h (Sem Extinção) $\times$ Teste 48h (Extinção)** – latência significativamente menor no grupo Extinção (Mann–Whitney U, $p = 0,0035$), evidenciando efeito da extinção na atenuação da resposta de esquia.

• **Treino × Teste 24h (Extinção)** – aumento significativo da latência no grupo Extinção (Wilcoxon pareado, $p = 0,0010$), indicando que, nesse momento intermediário, ainda há presença de resposta de medo.

Esses resultados confirmam que o protocolo adotado induz memória aversiva robusta no grupo Sem Extinção e que a manipulação experimental reduz a resposta de esquiva no grupo Extinção. Além disso, a persistência de latências elevadas no teste de 24h pós-extinção no grupo Extinção reforça a ideia de que o processo de extinção envolve etapas dinâmicas, inicialmente demandando tomada de decisão sob ameaça presumida e, posteriormente, permitindo a reavaliação do contexto como seguro.

Durante a sessão de extinção, na qual o animal é colocado sobre a plataforma e ele desce, observamos que o acoplamento fase–amplitude entre oscilações teta e de alta frequência (HFO) no hipocampo variou de acordo com o momento comportamental (Figura 3). A análise dos comodulogramas revelou aumento claro da modulação teta–HFO no intervalo imediatamente anterior à descida (5–0 s), em comparação com o período de 10–5 s prévio. Esse efeito foi confirmado pela análise estatística do índice de modulação (MI) normalizado (Figura XX), que mostrou diferença significativa entre os intervalos (teste de Friedman, $\chi^2 = 17,54$, $p < 0,0001$). O pós-teste de Dunn indicou que o MI foi significativamente maior em 5–0 s antes do step-down em relação a 10–5 s antes (** $p < 0,001$) e também em relação ao intervalo de 0–5 s após (* $p < 0,01$). Esses resultados sugerem que o aumento do acoplamento teta–HFO precede a resposta de esquiva, possivelmente refletindo maior demanda de processamento avaliativo diante da ameaça.

Além disso, a análise de regressão linear entre o MI normalizado e a razão de latência Reteste/Teste revelou associação positiva significativa (Figura 3c; $R^2 = 0,649$, $p = 0,031$). Esse achado indica que animais com maior acoplamento teta–HFO durante o momento crítico da extinção apresentaram maior manutenção da resposta de esquiva no reteste, sugerindo que a atividade oscilatória hipocampal pode prever a persistência da memória aversiva.

(a) Representação esquemática dos estados comportamentais durante os intervalos de 10–5 s antes, 5–0 s antes e 0–5 s após o step-down, acompanhada pelos comodulogramas correspondentes (frequência de fase × amplitude).

(b) Índice de modulação (MI) teta–HFO normalizado nos três intervalos comportamentais mostrados em (a). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (SEM). O teste de Friedman revelou efeito significativo ($\chi^2 = 17,54$, $p < 0,0001$). O pós-teste de Dunn com correção de Bonferroni indicou diferença significativa entre 10–5 s antes e 5–0 s antes (** $p < 0,001$) e entre 5–0 s antes e 0–5 s após (* $p < 0,01$).

(c) Regressão linear entre o MI normalizado e a razão Reteste/Teste. Observou-se associação positiva significativa ($R^2 = 0,649$, $p = 0,031$), indicando que maiores valores de modulação teta–HFO estão relacionados a uma maior razão de latência no reteste, refletindo um comportamento de esquiva sustentado.

Conclusão

Nosso estudo destaca o acoplamento teta-HFO como um promissor marcador eletrofisiológico para a memória de extinção. Essas descobertas ajudam a preencher uma lacuna crítica na nossa compreensão dos mecanismos neurais subjacentes à aprendizagem de extinção aversiva. Pesquisas futuras irão explorar se interrupções nesse mecanismo de acoplamento afetam a aquisição e a recordação da memória de extinção, potencialmente oferecendo insights mais profundos sobre a base neural dos transtornos de memória traumática.

Referências

ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol*, 11(2):180-7, 2001.

BOUTON ME, THRAILKILL EA, TRASK S, ALFARO F. Correction of response error vs. stimulus error in the extinction of discriminated operant learning. *J Exp Psychol Anim Learn Cogn* 46: 398–407, 2020.

BOUTON, Mark E.; WOODS, A. M. Extinction: Behavioral mechanisms and their implications. *Learning and memory: A comprehensive reference*. Oxford: Academic Press, v. 2, p. 61-83, 2017.

BROWN, Alexa; VILLARUEL, Franz R.; CHAUDHRI, Nadia. Neural correlates of recall and extinction in a rat model of appetitive Pavlovian conditioning. *Behavioural Brain Research*, v. 440, p. 114248, 2023.

CAMMAROTA, Martín et al. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstallation of an extinguished conditioned fear response. *Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 3, p. 737-741, 2003.

DVIR, Maor et al. Fear conditioning and extinction in anxious and non-anxious youth: A meta-analysis. *Behaviour research and therapy*, v. 120, p. 103431, 2019.

FRIES, P. Rhythms for Cognition: Communication through Coherence. *Neuron* 88, 220–235 628, 2015.

GOLD, Paul E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavioral & Neural Biology*, 1986.

IZQUIERDO, Iván; BEVILAQUA, Lia RM; CAMMAROTA, Martín. A arte de esquecer. *estudos avançados*, v. 20, p. 289-296, 2006.

IZQUIERDO, Ivan; FURINI, Cristiane RG; MYSKIW, Jociane C. Fear memory. *Physiological reviews*, v. 96, n. 2, p. 695-750, 2016.

JABLONSKI, S. A. et al. Determinants of novel object and location recognition during development. *Behavioural brain research*, v. 256, p. 140-150, 2013.

MCGAUGH, J. L.; MCINTYRE, C. K.; POWER, A. E. Amygdala modulation of memory consolidation: interaction with other brain systems. *Neurobiol Learn Mem*, 78(3):539-52, 2002.

MCGAUGH, James L.; SHAW, Gordon L. Neurobiology of learning and memory. World Scientific, 1990.

Pavlov, I.P. Conditional reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. Oxford, England: Oxford Univ. Press, 1927.

RADISKE, Andressa et al. Cross-frequency phase-amplitude coupling between hippocampal theta and gamma oscillations during recall destabilizes memory and renders it susceptible to reconsolidation disruption. *Journal of Neuroscience*, v. 40, n. 33, p. 6398-6408, 2020.

RAMANATHAN, Karthik R. et al. Prefrontal projections to the thalamic nucleus reuniens mediate fear extinction. *Nature communications*, v. 9, n. 1, p. 4527, 2018.

RESCORLA RA. Deepened extinction from compound stimulus presentation. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 32: 135–14, 2006.

RESCORLA, RA (2001). Retraining of extinguished Pavlovian stimuli. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 27 (2), 115.

ROSSATO, Janine I. et al. PKM ζ inhibition disrupts reconsolidation and erases object recognition memory. *Journal of Neuroscience*, v. 39, n. 10, p. 1828-1841, 2019. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/jneuro/39/10/1828.full.pdf>. Acesso em: 03 mai. 2021.

TORT, Adriano BL et al. Theta–gamma coupling increases during the learning of item–context associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 49, p. 20942-20947, 2009.

VIANNA, Monica RM et al. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 21, p. 12251-12254, 2001.

WHITE, N. M.; MCDONALD, R. J. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem*, 77(2):125-8, 2002.

Anexos

Figura 1. Esquema do protocolo experimental.

Figura 2. Extinção na tarefa de esquiiva inibitória step-down.

Figura 3. Acoplamento fase–amplitude teta–HFO no hipocampo durante a tarefa de esquiiva inibitória com step-down.

CÓDIGO: SB0627

AUTOR: ANA LUIZI BARACHO DA SILVA

COAUTOR: THAIS PRISCILA LIMA SILVA

COAUTOR: JANINE INEZ ROSSATO

COAUTOR: GÊNEDY KARIELLY DA SILVA APOLINÁRIO

COAUTOR: ANNA LYVIA AZEVEDO CAVALCANTE

ORIENTADOR: MARTIN PABLO CAMMAROTA

TÍTULO: Envolvimento da degradação proteica hipocampal na persistência da memória de extinção

Resumo

As memórias de medo podem ser bastantes persistentes, no entanto, não são estáticas: quando evocadas, podem seguir caminhos distintos. A evocada repetida não reforçada pode levar ao processo de extinção, no qual uma nova memória reduz a resposta aversiva original. Por outro lado, a evocação também pode tornar a memória lábil, exigindo sua reestabilização por meio da síntese proteica em um processo denominado reconsolidação. Estudos indicam que o hipocampo dorsal está envolvido na modulação das memórias de medo ou aversivas. No entanto, os mecanismos moleculares que regulam esse processo permanecem pouco compreendidos. Alguns estudos sugerem que a degradação proteica mediada pelo proteassoma controla a remodelação sináptica, regulando a disponibilidade de receptores AMPA na densidade pós-sináptica, os quais são fundamentais para a plasticidade sináptica e para o armazenamento de memórias. Neste trabalho utilizamos ratos machos Wistar com cânulas implantadas no hipocampo dorsal. Os animais foram submetidos ao protocolo de extinção na tarefa de esquiva inibitória e foram tratados com lactacistina ou pep2m. Nossos dados indicam que a infusão intra-hipocampal de lactacistina ou pep2m imediatamente após a reativação da memória de extinção prejudica a persistência da mesma, o que é evidenciado pelo aparecimento da memória de medo original.

Palavras-chave: Reconsolidação. Hipocampo. AMPA. Degradação proteica.

TITLE: Hippocampal protein degradation in the persistence of extinction memory

Abstract

Fear memories are highly persistent, yet they are not static. Upon retrieval, they may follow distinct trajectories. Repeated non-reinforced retrieval induces extinction, whereby a new memory trace attenuates the original aversive response. Conversely, retrieval can render the memory labile, requiring restabilization through protein synthesis in a process known as reconsolidation. Evidence indicates that the dorsal hippocampus contributes to the modulation of fear or aversive memories. However, the molecular mechanisms underlying this regulation remain poorly understood. Previous studies suggest that proteasome-mediated protein degradation governs synaptic remodeling by modulating the availability of AMPA receptors at the postsynaptic density, which are essential for synaptic plasticity and memory

storage. In the present study, we used male Wistar rats implanted with cannulae in the dorsal hippocampus. The animals underwent an extinction protocol in the inhibitory avoidance task and received treatment with lactacystin or pep2m. Our findings show that intra-hippocampal infusion of lactacystin or pep2m immediately after extinction memory reactivation impairs its persistence, as demonstrated by the re-emergence of the original fear memory.

Keywords: Reconsolidation. Hippocampus. AMPA. Protein degradation.

Introdução

A memória é a capacidade do indivíduo de recordar e armazenar informações (Nader, 2015). Tem a função de adaptar o organismo ao ambiente por meio da aprendizagem, modificando comportamentos para favorecer a sobrevivência (Ortega et al., 2022).

O aprendizado possibilita que informações adquiridas sejam armazenadas em memórias de longa duração (MLD), embora nem sempre com consequências positivas. Sobre isso, o medo intenso induz memórias persistentes que podem resultar em evitação exacerbada e levar ao desenvolvimento de fobias e outros transtornos de ansiedade (Glenberg, 1997; Almaraz et al., 2023).

As MLD não são fixas e imutáveis e a repetição de lembranças não reforçadas pode levar à redução gradual da resposta e à extinção do traço mnemônico, resultando em uma nova associação que diminui a intensidade da resposta original aprendida (Ferrara et al., 2019; Inda et al., 2011).

As MLD podem se desestabilizar quando reativadas e, para perdurarem, devem passar por uma reestabilização dependente da síntese protéica em um processo denominado reconsolidação (Misanin et al., 1968; Przybylski et al., 1997; Nader et al., 2000). Durante a reconsolidação, engramas preexistentes podem ser atualizados e reforçados (Hardt et al., 2010; McKenzie et al., 2011; Dudai, 2012). Assim, a reconsolidação e a extinção desempenham papéis opostos; a reconsolidação mantém ou fortalece a memória do medo, enquanto a extinção a enfraquece (Kida, 2023).

Nosso laboratório têm demonstrado que o hipocampo é fundamental para a ocorrência da reconsolidação da memória de extinção, sugerindo sua participação apenas quando a reativação envolve um erro de predição, ou seja, nos casos em que o que é esperado não condiz com o que de fato acontece (Rossato et al., 2010; Radiske et al., 2015; Radiske et al., 2017).

Embora numerosas evidências indiquem o envolvimento de diferentes proteínas na reconsolidação da memória de extinção, os mecanismos que regulam a degradação proteica nesse fenômeno permanecem pouco compreendidos. Algumas teorias apontam que a degradação proteica, mediada pelo proteassoma, regula a síntese proteica e a remodelação da densidade pós-sináptica por meio da eliminação de proteínas estruturais sinápticas (Kaang et al., 2009; Lee et al., 2008).

A comunicação sináptica é regulada em grande parte por alterações na composição das proteínas na sinapse, em particular, das proteínas localizadas na densidade pós-sináptica, que estruturam intimamente os receptores com seus sistemas de transdução de sinal. Além disso, mudanças duradouras na força da eficácia sináptica são controladas pela adição ou remoção de receptores na densidade pós-sináptica (Delint-Ramirez et al., 2010; Bats et al., 2007).

Os receptores AMPA são de extrema importância pois estão relacionados com a formação de circuitos neurais e com o processamento das informações no sistema nervoso central (Chater et al., 2014; Cao et. al., 2023). Sendo assim, a regulação da expressão e a função dos receptores AMPA é fundamental para os processos de aprendizado e memória (Cull-Candy et al., 2006; Traynelis et al., 2010; Swanson et al., 1997).

Portanto o entendimento de como a degradação proteica regula a síntese de proteínas na remodelação da densidade pós-sináptica, através da modificação da reciclagem de rAMPA é de suma importância, pois os processos plásticos relacionados ao processamento mnemônico dependem desta atividade sináptica.

Metodologia

Descrição da área de estudo e modelo animal

Trata-se de um estudo quantitativo com desenho de pesquisa do tipo experimental com a utilização de ratos machos adultos da linhagem Wistar. Todo o estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisas da Memória do Instituto do Cérebro (ICe) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) localizado em Natal, Rio Grande do Norte. Os animais serão tratados conforme a Lei número 6638 de 8/5/79 que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica. Eles receberam ração e água a vontade e permaneceram no ciclo de 12h claro/escuro, tendo a temperatura controlada (21°C). Em cada caixa (caixa padrão de polisulfona 49cm x 34cm x 16cm) foram mantidos 5 animais, sendo acopladas a um mini-isolador, com 40 trocas de ar por hora (Alesco®, Ltda., Monte Mor - São Paulo - Brasil). Seguindo as diretrizes éticas da Lei AROUCA (Lei nº 11.794/2008) aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRN, Certificado 384.010/2024. O aluno realizou o curso de manejo de animais (Figura 1).

Procedimentos cirúrgicos para implante de cânula

Para os procedimentos cirúrgicos de implantação de cânulas, os animais foram anestesiados por administração i.p. de cloridrato de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e posteriormente foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal (AP - 4.2 mm; ML $\pm$ 3.0 mm; DV - 3.0 mm; Paxinos e Watson, 2006). Como as cirurgias para implantação de cânulas no hipocampo duram em média 25-30 minutos, a associação de ketamina + xilazina, que possui um efeito anestésico leve a moderado, é suficiente para a segurança do animal. Os animais foram mantidos nas suas gaiolas moradias originais após o procedimento cirúrgico.

Todos os animais receberam meloxicam (2 mg/kg,s.c.) como analgésico imediatamente antes da cirurgia e nos três dias subsequentes. Os experimentos começaram de 7 a 10 dias após a cirurgia.

Procedimentos comportamentais na tarefa de esquiva inibitória (EI)

A tarefa de esquiva inibitória é comumente usada para investigar processos de aprendizagem e memória de evitação em roedores. Trata-se de um paradigma de condicionamento ao medo muito utilizado, no qual o estímulo condicionado é a parte segura da caixa, a plataforma, o estímulo incondicionado é um choque nas patas do animal quando o mesmo desce da plataforma e a resposta condicionada é permanecer na área segura, resultando no aumento da

latência de descida da plataforma após a exposição ao estímulo incondicionado (Cammarota et al., 2004; Bevilaqua et al., 2003).

O treino foi realizado em uma caixa de Plexiglas de 50 x 25 x 25 cm equipada com um piso de grade através do qual choques foram aplicados nas patas dos animais (Figura 2). Na extremidade esquerda do piso gradeado há uma plataforma de madeira de $5 \times 8 \times 25$ cm. Para o treinamento, os animais foram colocados na plataforma voltados para o canto traseiro esquerdo da caixa de treinamento e, ao descerem a grade com as quatro patas receberam um choque (0,4 mA durante 2 segundos). Imediatamente após o choque os animais foram removidos da caixa de treinamento e colocados na gaiola moradia. O tempo máximo de permanência na plataforma nessa sessão foi de 30 segundos; animais que não desceram nesse intervalo foram excluídos do estudo.

A extinção da memória foi conduzida em cinco sessões consecutivas, uma vez por dia. Em cada sessão, o animal foi colocado novamente sobre a plataforma, mas ao descer para o piso não recebia choque e podia explorar a caixa por 30 segundos. Caso não descesse espontaneamente em até 300 segundos, era empurrado até o piso gradeado. Animais que, ao final das sessões de extinção, apresentaram latência de descida superior a 30 segundos também foram excluídos do estudo. A reativação da memória de extinção ocorreu no 7º dia. Nessa sessão, o animal foi colocado na plataforma e, ao descer, foi imediatamente retirado da caixa, sem receber choque e, submetido aos diferentes tratamentos farmacológicos. A sessão de teste foi realizada 1 ou 7 dias após a reativação, muito semelhante a da sessão de treino, exceto pelo fato de que o animal não recebeu choque ao descer da plataforma (Figura 2).

Infusão das drogas

As microinjeções (1 µl/lado) foram realizadas em salas limpas adjacentes à sala experimental através de infusores acoplados às cânulas guia e conectados a seringas Hamilton com tubos Tygon. A taxa de fluxo (0,5 µl/min) foi controlada usando bombas de infusão. Após completar as microinjeções, deixamos os infusores no lugar por 1 min para minimizar o refluxo.

Drogas infundidas:

- PEP2m (inibe a interação NSF/rAMPA, inibe a expressão de rAMPA na membrana sináptica; 5 pmol/ul - Ralph et al., 2001; Rossato et al., 2019).
- LACTACISTINA (inibidor irreversível do proteassoma 26S; 32 ng/ul - Jarome et al., 2011).

Análise estatística dos dados

A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism. Para comparações entre dois grupos usamos o teste-t de Student, e para comparação entre três ou mais grupos, utilizamos ANOVA de medidas repetidas seguidas de Bonferroni. O nível de significância adotado foi 5%.

Resultados e Discussões

A recordação repetida e não reforçada pode induzir a extinção de memórias consolidadas, uma forma de aprendizagem que envolve a formação de uma nova associação que inibe a expressão da original. Estudos do nosso laboratório indicam que a recordação torna a memória de extinção suscetível à amnésia, indicando que esse tipo de memória é propenso à reconsolidação, que é evidenciado comportamentalmente pelo reaparecimento da memória de medo.

Nossos dados mostram que os animais efetivamente extinguem a memória de medo adquirida após o treinamento na esquiiva inibitória. A extinção é evidenciada pela redução da latência de descida da plataforma ao longo dos 5 dias de extinção. A figura 3 ilustra a extinção para os distintos tratamentos realizados, além da redução gradativa da latência de descida, podemos observar que as curvas de extinção não diferem para os distintos tratamentos realizados.

Quando investigamos se os tratamentos afetam a persistência da memória de extinção, observamos que a administração intra-hipocampal de lactacistina logo após a sessão de reativação prejudicou a retenção da memória em questão, esse prejuízo foi observado em um teste realizado 1 ou 7 dias mais tarde. Esse prejuízo é observado pelo aumento da latência de descida, evidenciando o prejuízo da memória de extinção, o que faz com que a memória de medo retorne (Figura 4A, Um teste t para amostras independentes indicou que os valores foram significativamente maiores no grupo que recebeu lactacistina após a reativação (Teste 1D - Média = 133,5; Desvio Padrão = 104,4) em comparação ao grupo que recebeu veículo (Média = 12,25; Desvio Padrão = 7,51); $t(21) = 4.02$, $p = 0.0006$, $d = 1.63$). Um teste t para amostras independentes indicou que os valores foram significativamente maiores no grupo que recebeu lactacistina após a reativação e foi treinado 7 dias depois ($M = 156.3$; $DP = 124.9$) em comparação ao grupo Veículo e foi treinado no mesmo intervalo de tempo ($M = 9.75$; $DP = 4.98$); $t(21) = 4.07$, $p = 0.0005$, $d = 1.61$). Para avaliar a janela de tempo deste efeito, fizemos o mesmo experimento só que desta vez a infusão foi realizada 6 horas após a reativação. Observamos que neste caso a lactacistina não prejudica a persistência da memória de extinção tanto em um teste realizado 1 como 7 dias mais tarde (Figura 4B). Para mostrar que o efeito da lactacistina está atrelado ao período que a memória de extinção é reativada, fizemos outro experimento onde a infusão foi feita um dia após o término da extinção, só que neste caso sem a sessão de reativação. Observamos que se a droga é infundida sem a sessão de reativação a persistência da memória de extinção é prejudicada (Figura 4C). Esses resultados indicam que a infusão de lactacistina logo após a reativação impede a persistência da memória de extinção, evidenciado pelo reaparecimento da memória de medo.

A literatura sugere que a degradação proteica está envolvida na regulação da reciclagem de receptores AMPA. Antes de avaliar a possível interação, fomos investigar se estes receptores são importantes para a persistência da memória de extinção após sua reativação. Os animais foram treinados e submetidos ao protocolo de extinção como descrito anteriormente. Um dia mais tarde, os animais passaram pela reativação ou não e, receberam infusão intra-hipocampal de pep2m. A memória de extinção foi testada 1 ou 7 dias mais tarde. Semelhante ao observado anteriormente, somente a infusão imediatamente após a reativação provoca amnésia (Figura 5A, estatística, Um teste t para amostras independentes indicou que os valores foram significativamente maiores no grupo que recebeu pep2m após reativação ($M = 99,82$; $DP = 61,67$) em comparação ao grupo que recebeu veículo ($M = 11,33$; $DP = 9,80$), $t(18) = 4,24$, $p = 0,0005$, $d = 1,91$). Um teste t para amostras independentes indicou que os valores foram significativamente maiores no grupo que recebe pep2m após a reativação ($M = 119,5$; $DP = 77,87$) em comparação ao grupo veículo ($M = 10,67$; $DP = 5,10$), $t(18) = 4,16$, $p = 0,0006$, $d = 1,87$.)

Se o tratamento é feito 6h após a reativação (Figura 5B) ou na ausência da reativação (Figura 5C) esse efeito amnésico não é observado.

Em conjunto, esses resultados indicam que tanto a degradação protéica dependente do proteassoma, inibida pela lactacistina, quanto a mobilização de receptores AMPA para a membrana sináptica, bloqueada pelo PEP2m, são processos necessários para a reconsolidação da memória extinção na esQUIVA inibitória.

Conclusão

Os resultados deste trabalho corroboram com dados prévios do laboratório, que mostram que a memória de extinção também pode ser reconsolidada. Visto que, se bloquearmos a degradação proteica e a inserção de receptores AMPA na sinapse, logo após a reativação, observamos amnésia para a memória de extinção, evidenciada pelo reaparecimento da memória original de medo.

Referências

ALMARAZ-ESPINOZA, A.; GRIDER, M. H. Physiology, Long Term Memory. In: StatPearls. StatPearls Publishing, 2023.

BATS, C. et al. The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking. *Neuron*, v. 53, n. 5, p. 719–734, 2007.

Bevilaqua, L. R. M., et al.. Role of protein phosphatase 2C from bovine adrenal chromaffin cells in the dephosphorylation of phospho-serine 40 tyrosine hydroxylase: Dephosphorylation of pSer40TH by PP2C. *Journal of Neurochemistry*, v. 85, n. 6, p 1368–1373, 2003.

CAO, Y. Y. et al. Molecular mechanisms of AMPA receptor trafficking in the nervous system. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 1, p. 111, 2023.

CHATER, T. E.; GODA, Y. The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 8, p. 401, 2014.

CULL-CANDY, S. et al. Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 16, n. 3, p. 288-297, 2006.

DELINT-RAMIREZ, I. et al. In Vivo Composition of NMDA Receptor Signaling Complexes Differs between Membrane Subdomains and Is Modulated by PSD-95 And PSD-93. *Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 24, p. 8162–8170, 2010.

DUDAI, Yadin. The restless engram: consolidations never end. *Annual Review of Neuroscience*, v. 35, n. 1, p. 227–247, 2012.

FERRARA, N. C. et al. GluR2 endocytosis-dependent protein degradation in the amygdala mediates memory updating. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 5180, 2019.

GLENBERG, A. M. What memory is for: Creating meaning in the service of action. *Behavioral and Brain Sciences*, v. 20, n. 1, p. 41–50, 1997.

HARDT, O. et al. A bridge over troubled water: reconsolidation as a link between cognitive and neuroscientific memory research traditions. *Annual Review of Psychology*, v. 61, n. 1, p. 141–167, 2010.

INDA, M. C. et al. Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *The Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 5, p. 1635–1643, 2011.

JAROME, T. J. et al. Activity Dependent Protein Degradation Is Critical for the Formation and Stability of Fear Memory in the Amygdala. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, p. e24349, 2011.

KAANG, Bong-Kiun. et al. Synaptic protein degradation as a mechanism in memory reorganization. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, v. 15, n. 5, p. 430–435, 2009.

KIDA, S. Interaction between reconsolidation and extinction of fear memory. *Brain Research Bulletin*, v. 195, p. 141-144, 2023.

LEE, S. et al. Molecular characterization of T-type Ca(2+) channels responsible for low threshold spikes in hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *Neuroscience*, v. 155, n. 4, p. 1195–1203, 2008.

MCKENZIE, S; EICHENBAUM, H. Consolidation and reconsolidation: two lives of memories? *Neuron*, v. 71, n. 2, p. 224–233, 2011.

MISANIN, J. R. et al. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*, v. 160, n. 3827, p. 554–555, 1968.

NADER, K. Reconsolidation and the dynamic nature of memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 7, n. 10, p. a021782, 2015.

NADER, K. et al. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, v. 406, n. 6797, p. 722–726, 2000.

ORTEGA-DE SAN LUIS, C.; RYAN, T. J. Understanding the physical basis of memory: Molecular mechanisms of the engram. *Journal of Biological Chemistry*, v. 298, n. 5, 2022.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Elsevier, 2006.

PRZYBYSLAWSKI, J.; SARA, S. J. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behavioural Brain Research*, v. 84, n. 1-2, p. 241–246, 1997.

RADISKE, A. et al. Prior learning of relevant nonaversive information is a boundary condition for avoidance memory reconsolidation in the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, v. 37, n. 40, p. 9675–9685, 2017.

RADISKE, A. et al. Requirement for BDNF in the reconsolidation of fear extinction. *The Journal of Neuroscience*, v. 35, n. 16, p. 6570–6574, 2015.

ROSSATO, J. I. et al. Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 50, p. 21801–21805, 2010.

ROSSATO, J. I. et al. PKM ζ Inhibition Disrupts Reconsolidation and Erases Object Recognition Memory. *The Journal of Neuroscience*, v. 39, n. 10, p. 1828–1841, 2019.

SWANSON, G. T. et al. Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition. *Journal of Neuroscience*, v. 17, n. 1, p. 58-69, 1997.

TRAYNELIS, S. F. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, v. 62, n. 3, p. 405-496, 2010.

Anexos

Figura 1. Certificado de conclusão do curso de ética e manejo de animais de laboratório.

Figura 2. Esquema do experimento na tarefa de Esquiva Inibitória (EI).

Figura 3. Curvas de extinção para os distintos tratamentos.

Figura 4. A infusão intra-hipocampal de lactacistina logo após a reativação prejudica a persistência da memória de extinção.

Figura 5. A infusão intra-hipocampal de pep2m logo após a reativação prejudica a persistência da memória de extinção.

CÓDIGO: SB0873

AUTOR: AMANDA DOMINGUES FONSECA

ORIENTADOR: KERSTIN ERIKA SCHMIDT

TÍTULO: Redes de axônios intracorticias e densidade de neurônios no cortex visual de *Dasyprocta leporina*

Resumo

Gatos e cutias, mesmo possuindo cérebros de tamanhos semelhantes, sendo ambos diurnos e possuindo uma boa acuidade visual, apresentam diferentes características quando comparadas no processamento da informação sensorial ao longo do sistema visual: Ao contrário da maioria dos predadores com olhos frontais, roedores como a cutia tem olhos laterais e não possuem fôvea, mas sim uma faixa visual retiniana. Como o gato, a cutia apresenta campos receptivos pequenos e seletividade moderada a alta à orientação no córtex visual primário (V1). No entanto, estudos anteriores mostraram que, apesar dessas boas propriedades visuais, a organização da seletividade à orientação em seu V1 segue um padrão tipo “sal e pimenta”, típico de roedores, e não o layout periódico em pinwheel observado em carnívoros felinos e primatas. Além disso, a seletividade da orientação na cutia não se mantém estável ao longo das diferentes frequências espaciais e temporais, como ocorre nos gatos. Para analisar mais profundamente, comparamos a seletividade espacial e temporal de neurônios com campos receptivos distribuídos em diferentes posições do campo visual em cutias e gatos, usando dados eletrofisiológicos coletados com um estímulo visual neutro quanto à orientação. Foram analisados dados de spikes, correlacionando a frequência espacial e a frequência temporal que obtiveram a maior taxa de disparo com a excentricidade e elevação dos campos receptivos dos neurônios registrados.

Palavras-chave: cortex visual, cutia, gato, frequência espacial, frequência temporal.

TITLE: Parallel neurophysiology of the rodent and feline visual cortex: spatial and temporal frequency processing along the visual field

Abstract

Cats and agoutis, although having similar brain sizes, being both diurnal and having a good visual acuity, present distinct characteristics when in comparison to the processing of the sensorial information along the visual system: opposed to most predators with their frontal eyes, rodents, as agoutis have lateral eyes and do not present fovea, but a particular structure, a visual streak. Similar to cats, agoutis display small receptive fields and a moderate to strong selectivity to orientation in the primary visual cortex (V1). Nevertheless, anterior studies showed that, despite these good visual properties, the orientation selectivity in V1 follows a pattern called “salt and pepper”, typical of rodents, and not the periodical layout in pinwheel observed in feline carnivores and primates. Furthermore, the orientation selectivity in agouti does not maintain stability throughout the different spatial and temporal frequencies, as it occurs in cats. To analyze it more profoundly, we compared the spatial and temporal selectivity of neurons with receptive fields distributed in different positions in the visual

streak in agoutis and cats, using electrophysiological data collected with a neutral visual stimulus. We studied spike statistics, relating visual stimulus parameters such as spatial frequency, temporal frequency with eccentricity and elevation of the neurons receptive fields.

Keywords: visual cortex, aguti, cat, spatial frequency, temporal frequency

Introdução

Mamíferos possuem adaptações a seus ambientes e hábitos de vida, especialmente se tratando de visão. Para exemplificar uma dualidade predador/presa, gatos e cutias serão objeto de nosso estudo, devido a similaridades como tamanho do cérebro, lifestyle diurno e serem altamente visuais. Gatos possuem, além de olhos frontais, pupilas verticais, que atuam no controle de luz e na percepção de profundidade, e retinas com maior número de fotorreceptores e células ganglionares na área centralis (Banks et al., 2015; Günter et al., 2025), semelhante a fóvea em primatas. Cutias possuem olhos laterais, pupilas arredondadas e a presença do visual streak, ou faixa retiniana, uma faixa horizontal onde há grande acuidade visual. Também é válido mencionar outra disparidade entre felinos e cutias: a organização columnar da seletividade à orientação. Nesse caso, os neurônios em uma mesma coluna apresentam preferência semelhante pela orientação do estímulo. A transição entre colunas com diferentes preferências angulares ocorre de forma gradual ao redor de singularidades (centros de pinwheel), e o padrão resultante de colunas é denominado mapa de preferência à orientação (Orientation Preference Map). O mapa cortical dos gatos é semelhante ao encontrado em primatas (Kaschube et al., 2014). Em contraste, cutias, grandes roedores, possuem olhos lateralizados, que atuam aumentando a área de visão para as laterais, possibilitando uma maior chance contra predadores. Seu mapa cortical é do tipo sal e pimenta, no qual a distribuição não segue um padrão de seletividade, mas sim seguindo a retinotopia e de clusters verticais (Ferreiro, 2018; Schmidt, Wolf, 2021). Interessantemente, a seletividade para orientação não parece ser estável - como nos gatos - mas muda com a frequência espacial do estímulo e mostra um grande viés para a orientação horizontal (Ferreiro et al., 2021). Já que a resolução espacial dos neurônios no córtex visual primário depende também da densidade de fotorreceptores da retina distribuída ao longo do campo visual, foi investigado a pergunta como a frequência espacial e temporal preferida muda ao longo do campo visual em gatos e cutias de forma sistemática. Por esse fim, foram utilizando dados que foram coletados com um estímulo visual sem orientação - um tabuleiro quadriculado de campo total - variando apenas a frequência espacial e temporal dos seus componentes. Essas características serão utilizadas nesse trabalho como forma de compreender melhor a relação entre as necessidades visuais e as preferências neuronais das determinadas espécies ao longo do via visual (Ibbotson, Jung, 2020). Além da análise dos dados eletrofisiológicos, foi feita uma análise histológica. Levando em consideração as semelhanças supracitadas entre as espécies, é possível estabelecer gatos como um grupo controle, devido a vasta literatura acerca de sua densidade celular e anatomia. Enquanto cutias, serão o objeto de estudo propriamente dito, tendo em vista a necessidade de dados acerca de seu córtex visual primário, tal como volume, espessura de mini colunas anatômicas, distanciamento de axônios, e densidade celular total e também no núcleo geniculado lateral, uma vez que ele contém os neurônios interligando as células ganglionares da retina com a camada IV do córtex visual primário. Levando em consideração fatores como a disponibilidade, o desempenho em experimentos anteriores e dados bibliográficos, selecionamos três marcadores fluorescentes: Dapi, interessante como contracoloração, NeuN, marcador de neurônios maduros, e Sinapsina, está associado às vesículas sinápticas. Para esse

estudo, em especial nos dedicamos para compreender a anatomia e averiguar na literatura o conhecimento acumulado sobre o núcleo geniculado lateral em roedores.

Metodologia

Foram utilizados dados referentes a experimentos anteriormente realizados pelo laboratório, sendo cinco gatos (*Felis catus* doméstica) e 11 cutias (*Dasyprocta leporina*), todas fêmeas (CEUA protocolo 006/2013). Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de 20 mg/kg de quetamina e 2 mg/kg de xilazina (gatos), e 40 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina (cutias). Em seguida, foram submetidos à ventilação artificial por meio de uma bomba hidráulica, além disso, uma mistura de gás oxigênio/óxido nitroso (25%/75%) com halotano (gato) ou isoflurano (cutia) foi passada por meio de um vaporizador para manter a anestesia geral. Para controlar movimentos oculares involuntários, após a cirurgia e durante todo o experimento, os animais foram paralisados com uma dose inicial intravenosa de pancurônio brometo (0,6 mg/kg para gatos e 0,3 mg/kg para cutias), seguida por infusão contínua (0,15 mg/kg/h para gatos e 0,10 mg/kg/h para cutias) (Ferreiro, 2018). Cerca de 16 a 32 eletrodos extracelulares foram implantados em regiões da área 17 e 18 em gatos, e área 17, em cutias. Para a parte dos estímulos visuais, 21 imagens contendo o tabuleiro de xadrez (checkerboard), foram apresentadas aleatoriamente, possuindo 7 frequências espaciais (0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28, e 2.56) e 3 frequências temporais (2, 4, 8 Hz), em um monitor a 57 cm de distância, com 21" CRT. Buscando estimular as regiões periféricas para obter dados de elevação e excentricidade, o monitor foi movido, para baixo, para cima e ao longo de um arco (Ferreiro, 2018). Para caracterizar os campos receptivos (RF, receptive fields) moveu-se uma barra em 16 direções diferentes. Para a análise do material, foram empregados o software JMP e a interface NES, do Labview. A partir de suas funcionalidades, conseguimos calcular algumas métricas relacionadas aos spikes obtidos nos experimentos, como taxa de disparo média, seletividade para orientação e a condição preferida, numa plataforma de análise de dados baseado em Labview (NES), e importamos essa informação para o programa de estatística JMP, onde conseguimos aplicar filtros e transformar os dados em gráficos e tabelas. Para a parte anatômica e histológica, foram utilizados cérebros de gatos e cutias post fixos em paraformaldehyde 4% (1 cérebro de gato, macho, 3 meses, 1 cérebro de cutia, fêmea adulta, cerca de 2 anos). Em ambos os cérebros foi feito um corte sagital ao longo da fissura inter-hemisférica, separando o hemisfério esquerdo. No cérebro de gato foram feitos cortes próximos à região do tálamo, separando parte do córtex da porção mais interna. A área diencefálica foi montada de forma lateral-medial, foram feitos cortes de 50 µm no vibrátomo. A área cortical foi submetida a cortes de 50 µm no criostato. Os cortes foram guardados em PBS e solução crioprotetora, respectivamente. No cérebro de cutia não houve separação entre a região do núcleo geniculado (diencefálica) e o córtex, os cortes foram feitos no vibrátomo com espessura de 70 µm. Para uma melhor visualização de estruturas, foi verificado se o tecido estava adequado para o processo de imunofluorescência e servir como guia para a contagem. Para o protocolo de Nissl, inicialmente lavamos as lâminas em água, em seguida em álcool 100% por 3 minutos, duas vezes, por conseguinte, em xilol, por 15 minutos, após isso, novamente será embebida por álcool 100%, por 10 minutos, seguido de duas etapas de 3 minutos. A solução é rapidamente re-hidratada em água destilada, posteriormente, colorida com cresil, por uma estimativa de 8 minutos e, a depender da necessidade do tecido, esse tempo pode ser estendido. Depois é submetido a imersão em álcool 70% por cerca de 30 segundos, seguido por duas baterias de álcool 100%, com 3 minutos cada, por fim, as lâminas são submetidas ao xilol por, no mínimo, 5 minutos. Para a imunofluorescência foram selecionados dois anticorpos: NeuN, DAPI (4',6-diamidino-2-

phenylindole) e Synapsin. Inicialmente, selecionamos os cortes desejados e despejamos PBS 10 mM gelado nos poços da placa, após isso, a placa será agitada. Uma solução para a recuperação antigênica é preparada, com os anticorpos e tampão citrato a 10 mM, essa solução é levada para o banho maria (60 °C) por 30 minutos. Para aumentar a permeabilidade da membrana, foi utilizado PBS e triton X. Remove-se a solução e acrescenta-se o tampão citrato novamente, levando para agitar. Retira-se os anticorpos do agitador e são feitas 3 lavagens no PBS 10 mM gelado, por 10 minutos, para retirar o excesso de anticorpo primário. Para os anticorpos secundários, utilizamos uma concentração de 5µl para cada 5ml de PBS+0,5% Tx, os anticorpos escolhidos foram anti-rabbit, verde 488 e anti-mouse, rosa 546. As amostras são incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida são feitas 3 lavagens em PBS por 10 minutos. Para a montagem, utiliza-se o meio de montagem millwall, e foram utilizadas lâminas não gelatinizadas

Resultados e Discussões

Durante as análises, é possível perceber que os resultados encontrados para a distribuição da frequência espacial (SF) e temporal (TF) preferida em relação a elevação e excentricidade, estão de acordo com a distribuição anatômica de células ganglionares da retina, em ambas as espécies. Em cutias, há uma região bastante horizontalizada da retina, onde encontram-se células ganglionares com intensidade. Em gatos, há uma região mais central, e há uma diminuição da densidade circularmente (Ibbotson, Jung, 2020). Em cutias, ao analisar ao longo do visual streak (ou seja, a região horizontal com maior densidade de células da retina), a SF e TF preferida não muda, contudo, um achado interessante é que o SF decai rapidamente com o aumento da elevação do campo visual (F-test, p-value=0.002), também em concordância com os dados anatômicos de menor densidade de fotorreceptores. Ainda se tratando de cutias, há uma preferência de neurônios no córtex visual primário pela orientação horizontal, estes, encontram-se igualmente distribuídos no campo visual, indicando a falta de relação entre a preferência de SF/TF e o viés horizontal. Em gatos, há uma divisão entre áreas 17 e 18, enquanto em cutias há apenas a área 17. Os achados para essas áreas foram que, em gatos, a TF preferida aumenta rapidamente quando saímos da região central da retina, enquanto a SF diminui de forma devagar, mais uma vez refletindo o gradiente celular entre diferentes densidades de células ganglionares do tipo X - com resolução espacial alta e alta densidade na região central - e do tipo Y - com resolução temporal alta. Foi observado que a razão X-Y diminui em direção à periferia da retina em gatos (Stone, 1974), corroborando que a resolução do temporal deveria aumentar na periferia do campo visual em gatos. Durante o curso do período, ainda foi possível a participação em um editorial focus, ele se baseia na publicação de Jung et al. 2025 (na revista Journal of Neurophysiology) envolvendo a caracterização dos campos receptivos de neurônios do núcleo geniculado do tammar wallaby. O focus busca compreender se a seletividade a orientação evoluiu da mesma maneira nos grupos Eutheria (incluindo os primatas, gatos e roedores) e Metatheria (incluindo os marsupiais como o wallaby), é possível ver uma comparação entre a seletividade para orientação em V1, no núcleo geniculado e no superior colliculus de diferentes ordens, como primatas, roedores e marsupiais. Os principais achados indicam uma convergência evolutiva (Schmidt et al., 2025). Para a parte histológica e anatômica, não foi possível chegar a uma conclusão, tendo em vista as inúmeras intercorrências durante o percurso, essas se deram principalmente durante o protocolo de Nissl, em que os cortes consistentemente não permaneciam nas lâminas, mesmo com a mudança de lâminas e mudança de alguns aspectos a respeito do protocolo, como banhar as lâminas de modo horizontal, ainda foram mal sucedidas. Durante o protocolo de imunofluorescência,

conseguimos detectar a presença de anticorpos para DAPI e Synapsin, mas NeuN resultou em uma marcação fraca, isto pode ser em virtude da validade dos anticorpos, seria interessante repetir a técnica com anticorpos mais novos. A marcação com DAPI e Synapsin indica a presença de ácidos nucleicos e associada à membrana das vesículas sinápticas, respectivamente, portanto, é possível indicar a presença de células nervosas, possibilitando a sua contagem.

Conclusão

Em se tratando das análises computacionais, os resultados encontrados são concordantes com a literatura já existente e a anatomia dos respectivos animais. Para as análises laboratoriais de imunofluorescência e Nissl, são necessários novos procedimentos para maiores conclusões.

Referências

BANKS, M. S. et al. Why do animal eyes have pupils of different shapes? *Science advances*, v. 1, n. 7, p. e1500391, 2015. GÜNTER, A. et al. Exploration of the visual streak of the Mongolian gerbil as a model for the human central retina. *Frontiers in medicine*, v. 12, p. 1562437, 2025. KASCHUBE, Matthias. Neural maps versus salt-and-pepper organization in visual cortex. *Current opinion in neurobiology*, v. 24, n. 1, p. 95–102, 2014. FERREIRO, D. N. et al. Spatial clustering of orientation preference in primary visual cortex of the large rodent agouti. *iScience*, v. 24, n. 1, p. 101882, 2021. FERREIRO, Dardo Nahuel. Orientation selectivity of neurons and their spatial layout in cat and agouti primary visual cortex. 2018. 67f. Tese (Doutorado em Neurociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018. SCHMIDT, K. E.; WOLF, F. Punctuated evolution of visual cortical circuits? Evidence from the large rodent *Dasyprocta leporina*, and the tiny primate *Microcebus murinus*. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 71, p. 110–118, 2021. IBBOTSON, M.; JUNG, Y. J. Origins of functional organization in the visual cortex. *Frontiers in systems neuroscience*, v. 14, p. 10, 2020. FUKUDA, Y.; STONE, J. Retinal distribution and central projections of Y-, X-, and W-cells of the cat's retina. *Journal of neurophysiology*, v. 37, n. 4, p. 749–772, 1974.

CÓDIGO: SB0881

AUTOR: RODRIGO OLIMPIO ORVATE ARRUDA

COAUTOR: MARTIN PABLO CAMMAROTA

COAUTOR: GENEDY KARIELLY DA SILVA APOLINARIO

COAUTOR: LUCAS DENYLSO RIBEIRO FARIAS SANTOS

COAUTOR: JOHSEPH PABALLO GOMES DE SOUZA

ORIENTADOR: JANINE INEZ ROSSATO

TÍTULO: Impacto da inibição da degradação de proteínas na atividade eletrofisiológica

Resumo

A formação e atualização das memórias dependem de um balanço entre a síntese e a degradação de proteínas. Embora a degradação via proteassoma seja reconhecida como crucial para a consolidação de memórias de longa duração, seu papel na regulação da atividade de redes neurais em tempo real é pouco compreendido. Este estudo investigou como a inibição da degradação proteica afeta as oscilações no hipocampo, uma atividade neural essencial para o processamento cognitivo. Ratos Wistar foram submetidos a cirurgia para implante de matrizes de microeletrodos com cânulas na área CA1 do hipocampo dorsal. Após a recuperação, os animais receberam infusões locais do inibidor do proteassoma, a lactacistina, ou veículo. Registros de potencial de campo local (LFP) foram realizados antes e por até 120 minutos após as infusões. Os resultados revelam que a inibição do proteassoma induz uma supressão seletiva e significativa na potência da banda de frequência teta (5-10 Hz). Em contraste, a potência nas bandas gama de baixa e média frequência não foi alterada, enquanto a de alta frequência parece estar aumentada. Concluímos que a degradação proteica é um mecanismo vital para a manutenção da integridade e potência do ritmo teta, a principal oscilação hipocampal para o processamento mnemônico.

Palavras-chave: Hipocampo; Degradação proteica; Oscilações neurais; Ritmo gama.

TITLE: Impact of protein degradation inhibition on electrophysiological activity

Abstract

The formation and updating of memories depend on a balance between protein synthesis and degradation. Although proteasome-mediated degradation is recognized as crucial for the consolidation of long-term memories, its role in regulating real-time neural network activity is poorly understood. This study investigated how the inhibition of protein degradation affects hippocampal oscillations, an essential neural activity for cognitive processing. Wistar rats underwent surgery for the implantation of microelectrode arrays with cannulas in the dorsal hippocampal CA1 area. Following recovery, the animals received local infusions of the proteasome inhibitor, lactacystin, or a vehicle. Local field potential (LFP) recordings were performed before and for up to 120 minutes after the infusions. The results reveal that proteasome inhibition induces a selective and significant suppression in the power of the

theta frequency band (5-10 Hz). In contrast, the power in the low and mid-gamma frequency bands was not altered, while the high-frequency gamma seems to be increased. We conclude that continuous protein degradation is a vital mechanism for maintaining the integrity and power of the theta rhythm, the main organizing oscillation of the hippocampus for mnemonic processing.

Keywords: Hippocampus; Protein degradation; Neural oscillations; Gamma rhythm.

Introdução

A formação e atualização das memórias dependem da capacidade do cérebro de modificar a força das conexões neurais para ocorrerem (McGaugh, 2000). Esse tipo de modificação é estabelecido por meio de alterações na composição proteica das sinapses, especialmente nas densidades pós-sinápticas, onde a adição ou a remoção de receptores modula a eficácia da comunicação neuronal (Anggono & Huganir, 2012). Esse dinâmico remodelamento é orquestrado por dois processos celulares fundamentais e antagônicos: a síntese de novas proteínas e a degradação seletiva de proteínas já existentes.

Embora ambos os processos sejam cruciais, as pesquisas em neurobiologia da memória têm focado principalmente na investigação do papel da síntese de novas proteínas no processamento mnemônico de longa duração (Alberini & Kandel, 2015). Contudo, evidências crescentes apontam que a degradação proteica, mediada principalmente pelo sistema ubiquitina-proteassoma, pode ser igualmente essencial (Jarome & Helmstetter, 2014; Hedge, 2022; Lee & Kaang, 2023). Para investigar esse sistema, são utilizados inibidores farmacológicos como a lactacistina, um composto que se liga de forma covalente e inibe irreversivelmente a atividade catalítica do proteassoma 26S, bloqueando a degradação de proteínas marcadas com ubiquitina (Goo & Han, 2024). A inibição da degradação proteica é capaz de prejudicar a manutenção da potenciação de longa duração (LTP), fenômeno reconhecido como correlato celular da memória (Karpova et al., 2006), sugerindo que a remoção seletiva de proteínas é um passo indispensável para a flexibilidade sináptica que sustenta o aprendizado. No entanto, a forma como essa regulação molecular em nível de sinapses individuais se traduz em padrões de atividade de larga escala, que coordenam o processamento de informações no cérebro, ainda é pouco compreendida.

Esses padrões manifestam-se como ritmos ou oscilações, os quais refletem a atividade síncrona de grandes populações de neurônios (Buzsaky, 2006). No hipocampo, estrutura-chave para a formação das memórias, as oscilações cerebrais nas faixas de frequência teta (4-8 Hz) e gama (30-100 Hz) são proeminentes. O ritmo teta está associado à exploração e ao aprendizado, enquanto a gama está ligada a outros processos cognitivos complexos, como a atenção, a percepção sensorial e a ligação de características de um objeto em uma representação coerente (Buzsaky, 2006). Notavelmente, a atividade coordenada em ambas as bandas é considerada um mecanismo fundamental para a codificação e a recuperação de informações mnemônicas (Lisman & Jensen, 2013; Jensen & Colgin, 2007). Se esses ritmos coordenados emergem da comunicação precisa entre milhões de sinapses, e a degradação proteica é crucial para ajustar a função de cada uma dessas sinapses, então é razoável supor que os dois processos estejam intimamente ligados.

Partindo dessa premissa, o presente trabalho analisa esta hipótese, investigando qual é o impacto da inibição aguda da degradação proteica sobre a atividade oscilatória hipocampal. O objetivo central da pesquisa foi estudar as alterações da atividade oscilatória hipocampal causadas pela infusão de lactacistina, um inibidor da degradação proteica, avaliando especificamente seus efeitos sobre as oscilações teta e gama. Ao investigar a relação entre a degradação proteica que ocorre nas sinapses, um processo molecular intrínseco à atividade

cerebral, e um fenômeno de rede neural essencial para a memória, este estudo contribui para o melhor entendimento dos processos fisiológicos subjacentes às funções cognitivas.

Metodologia

Animais experimentais e condições de manutenção

O estudo utilizou ratos Wistar machos adultos ($N = 10$), provenientes do biotério do Instituto do Cérebro (ICe) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), onde todos os procedimentos foram realizados. Os animais foram mantidos em caixas padrão com 5 animais por caixa, em um ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e sob ciclo claro/escuro de 12h com acesso livre à água e ração, seguindo as diretrizes éticas da Lei AROUCA (Lei nº 11.794/2008) aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRN (Certificado 384.010/2024). O aluno realizou o curso de manejo de animais (Figura 1).

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com isoflurano (indução 2-5%, manutenção 0.5-2%) e submetidos a cirurgia estereotáxica para o implante unilateral de uma matriz de 16 canais de microeletrodos de tungstênio ($35\ \mu\text{m}$) acoplada a uma cânula de infusão. O alvo foi a camada piramidal da área CA1 do hipocampo dorsal (coordenadas: AP -4.2 mm, ML +2.4 mm, DV -3.0 mm; Paxinos & Watson). Parafusos de ancoragem e um parafuso de aterramento foram fixados ao crânio. Os animais receberam analgesia com meloxicam ($2\ \text{mg/kg}$, s.c.) antes da cirurgia e nos três dias subsequentes, sendo alojados individualmente para recuperação por um período de 7 a 10 dias antes do início dos experimentos.

Registro eletrofisiológico e infusão

O protocolo experimental, ilustrado na Figura 2, consistiu em colocar o animal em um campo aberto para a habituação e registro da atividade elétrica por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a infusão intra-hipocampal de uma das seguintes soluções: Veículo (VEH): Solução salina 0,9 % ($N = 5$) Lactacistina (LAC): Inibidor irreversível do proteassoma 26S; $32\ \text{ng}/\mu\text{l}$ em solução salina ($N = 5$). As infusões (volume total de $1\ \mu\text{l}$) foram realizadas a uma taxa de $0.5\ \mu\text{l}/\text{min}$. Após a infusão, o animal retornou ao campo aberto e a atividade de potencial de campo local (LFP) foi registrada continuamente, avaliando-se os efeitos da droga nos minutos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 e 120. A atividade elétrica foi registrada com o sistema CerePlex Direct (Blackrock Microsystems). Os sinais de potencial de campo local (LFP) foram adquiridos a 30 kHz, com um filtro passa-banda de 0.3 - 500 Hz.

Análise dos dados e estatística

A análise foi realizada offline com rotinas customizadas em Python 3.14. Para calcular a potência espectral, foi utilizado o método do periodograma de Welch (janelas de Hamming de 3s, sobreposição de 75%). A potência foi calculada para as seguintes bandas de frequência: teta (5-10 Hz), slow gamma (30-55 Hz), mid-gamma (55-85 Hz) e fast-gamma (85-120 Hz). As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando ANOVA de duas vias (fatores: grupo e tempo) com múltiplas comparações seguidas pela correção de Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0.05$.

Resultados e Discussões

A infusão intra-hipocampal do inibidor do proteassoma, lactacistina, induziu alterações neurofisiológicas específicas e duradouras. A análise da atividade oscilatória no hipocampo ipsilateral à infusão revelou um perfil de desregulação altamente seletivo, com um impacto proeminente e supressor na banda de frequência teta, contrastando com os efeitos observados na banda gama. O principal achado deste estudo foi o efeito seletivo da LAC sobre o ritmo teta. A análise quantitativa da variação da potência espectral, normalizada pelo período basal, está apresentada nas Figura 3A-D. A Figura 3A, mostra que existe diferença na banda da oscilação teta para os grupos VEH e LAC. Essa diferença emerge logo após a infusão e se sustenta por até uma hora. Enquanto o grupo controle (VEH) exibiu uma potência teta estável, oscilando naturalmente em torno da linha de base (100%), o grupo tratado com LAC apresentou uma queda abrupta. Esta supressão atingiu seu pico entre 10 e 25 minutos pós-infusão e permaneceu robustamente abaixo do grupo controle por até uma hora, indicando um colapso prolongado deste ritmo. A Análise de Variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas revelou um efeito nos fatores grupo e tempo ($F(1,8) = 9.912$, $p = 0.0136$ para grupo e $F(2.357, 18.86)$, $p = 0.0097$ para tempo). Este resultado é de suma importância, pois indica que a trajetória da potência teta ao longo do tempo foi significativamente diferente entre os animais que receberam a droga e os que receberam o veículo. As comparações múltiplas com correção de Bonferroni, cujos resultados são indicados pelos asteriscos na Figura 3A, detalharam essa interação, apontando que a potência no grupo LAC foi significativamente menor que no grupo VEH em múltiplos pontos temporais, entre os minutos 10 e 30 após a infusão (5-10 min, $p < 0.01$; 10-15 min, $p < 0.05$; 15-20 min, $p < 0.01$ e 25-30 min, $p < 0.05$, em um teste de Bonferroni).

Em notável contraste com o forte efeito supressor observado em teta, a análise das sub-bandas de gama revelou que a inibição do proteassoma não causou uma redução de potência. Para as bandas de low gamma (Figura 3B) e fast gamma (Figura 3C), as curvas de variação de potência dos grupos LAC e VEH permaneceram sobrepostas durante os 120 minutos. A ANOVA corrobora esta observação, não detectando efeito do tratamento (Low gamma: $F(1,8) = 0.165$, $p = 0.695$; Mid gamma: $F(1,8) = 0.033$, $p = 0.859$), o que confirma que a lactacistina não alterou a potência nestas faixas de frequência. Curiosamente, foi observado um efeito principal do fator tempo para ambas as bandas (Low gamma: $F(4.391, 35.13) = 10.70$, $p < 0.0001$; Mid gamma: $F(3.906, 31.25) = 18.74$, $p < 0.0001$). Isso sugere que a potência variou ao longo do experimento de forma similar em ambos os grupos, possivelmente devido a fatores comportamentais como a habituação ao ambiente, mas independentemente da ação da droga. A análise da banda de fast gamma (Figura 3D) também não revelou um impacto da droga. Embora o gráfico possa sugerir uma leve tendência de aumento de potência no grupo LAC, a ANOVA não encontrou efeito de interação ($F(8, 64) = 1.165$, $p = 0.3361$) nem efeito principal do Tempo ($F(4.451, 35.61) = 1.957$, $p = 0.1215$). Portanto, de acordo com a análise estatística, a inibição do proteassoma não induziu alterações significativas na potência desta banda.

A profunda desregulação do ritmo teta, quantificada acima, é também claramente observável nos registros brutos (Figura 4) e na análise tempo-frequência (Figura 5) de animais representativos. A Figura 4 compara os traçados do Potencial de Campo Local (LFP). Em condições basais, ambos os grupos exibem uma oscilação de alta amplitude e com uma ritmicidade quase sinusoidal, característica do estado de vigília ativa. Após a infusão, o animal controle (Figura 4A) mantém essa estrutura rítmica, enquanto o traçado do animal tratado com lactacistina (Figura 4B) torna-se visivelmente desorganizado, perdendo sua regularidade e apresentando uma amplitude reduzida. Esta perda de organização rítmica é visualmente detalhada nos espectrogramas da Figura 5. O espectrograma de um animal controle (Figura 5A) exibe uma "banda" horizontal de alta potência (indicada pela cor

amarela/vermelha) estável e bem definida, centrada na faixa de frequência teta (~8 Hz) durante todo o experimento. Em contrapartida, no animal tratado com lactacistina (Figura 5B), esta banda de potência teta, inicialmente presente no período basal, torna-se progressivamente mais fraca, pálida e fragmentada nos períodos pós-infusão, ilustrando o colapso da principal dinâmica oscilatória do hipocampo. Juntas, estas figuras fornecem uma evidência qualitativa robusta que suporta os achados quantitativos, demonstrando que a inibição da degradação protéica leva a uma profunda e seletiva desorganização da atividade neural hipocampal, centrada na supressão do ritmo teta.

Conclusão

Este estudo demonstrou que a degradação proteica mediada pelo proteassoma no hipocampo é um regulador crítico da dinâmica de rede neural. Portanto, a inibição da degradação protéica leva a uma redução potente e seletiva na potência da oscilação teta, um ritmo fundamental para a função hipocampal. Em contraste, a atividade na banda gama não foi suprimida; enquanto as sub-bandas de baixa e média frequência permaneceram inalteradas, a potência na gama de alta frequência aumentou significativamente. Esses achados sugerem que a função do proteassoma transcende a simples manutenção estrutural ou a consolidação de memórias de longo prazo. A degradação proteica contínua parece ser um mecanismo ativo e essencial para a manutenção do ritmo organizador teta e, ao mesmo tempo, parece regular de forma distinta os microcircuitos que geram as oscilações de alta frequência. Como sugestão para pesquisas futuras, seria importante identificar as proteínas específicas cuja acumulação, devido à inibição do proteassoma, é responsável por esses efeitos eletrofisiológicos, utilizando técnicas de proteômica. Além disso, investigar se a manipulação da degradação protéica afeta de forma similar outros tipos de acoplamento de frequência ou a atividade de subtipos específicos de interneurônios poderia aprofundar nossa compreensão sobre este novo eixo de regulação da função cerebral.

Referências

- ALBERINI, C. M.; KANDEL, E. R. The regulation of transcription in memory consolidation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 7, n. 1, p. a021741, 2015.
- ANGGONO, V.; HUGANIR, R. L. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Current opinion in neurobiology*, v. 22, n. 3, p. 461-469, 2012.
- BATS, C.; GROG, L.; CHOQUET, D. The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron*, v. 53, n. 5, p. 719-734, 2007.
- BUZSAKY, G. *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press, 2006.
- BUZSAKY, G. Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus*, v. 25, n. 10, p. 1073-1188, 2015.
- DELINT-RAMIREZ, I. et al. In vivo composition of NMDA receptor signaling complexes differs between membrane subdomains and is modulated by PSD-95 and PSD-93. *Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 24, p. 8162-8170, 2010.
- GOO, M.; HAN, K. Ubiquitination in control of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 56, n. 2, p. 263-272, 2024.
- HEGDE, A. N. The Ubiquitin-Proteasome System in Synaptic Function and Dysfunction. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 15, p. 846939, 2022.

- JAROME, T. J.; HELMSTETTER, F. J. The ubiquitin-proteasome system as a critical regulator of synaptic plasticity and long-term memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 105, p. 107-116, 2013.
- JAROME, T. J.; HELMSTETTER, F. J. Protein degradation and protein synthesis in long-term memory formation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 7, p. 61, 2014.
- JENSEN, O.; COLGIN, L. L. Cross-frequency coupling between neuronal oscillations. *Trends in Cognitive Sciences*, v. 11, n. 7, p. 267-269, 2007.
- KAANG, B. K.; LEE, S. H.; KIM, H. Synaptic protein degradation as a mechanism in memory reorganization. *The Neuroscientist*, v. 15, n. 5, p. 430-435, 2009.
- KARPOVA, A. et al. Involvement of protein synthesis and degradation in long-term potentiation of Schaffer collateral CA1 synapses. *Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 18, p. 4949-4955, 2006.
- LEE, S. H. et al. Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science*, v. 319, n. 5867, p. 1253-1256, 2008.
- LEE, S. H.; KAANG, B. K. New insights into the role of protein degradation in memory consolidation. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 24, n. 7, p. 415-431, 2023.
- LISMAN, J. E.; JENSEN, O. The θ - γ neural code. *Neuron*, v. 77, n. 6, p. 1002-1016, 2013.
- LOPEZ-SALON, M. et al. The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *European Journal of Neuroscience*, v. 14, n. 11, p. 1820-1826, 2001.
- LU, J. et al. Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to Homer. *Neuron*, v. 55, n. 6, p. 874-889, 2007.
- MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. *Science*, v. 287, n. 5451, p. 248-251, 2000.
- PASZKIEL, S.; DOBRAKOWSKI, P.; ŁYSIAK, A. The Impact of Different Sounds on Stress Level in the Context of EEG, Cardiac Measures and Subjective Stress Level: A Pilot Study. *Brain Sciences*, v. 10, n. 10, p. 728, 2020.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5. ed. Elsevier, 2006.
- ROOPUN, A. K. et al. A beta2-frequency (20-30 Hz) oscillation in nonsynaptic networks of somatosensory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 42, p. 15646-15650, 2006.

Anexos

Figura 1 - Certificado do curso de extensão de formação em proteção dos animais usados em pesquisas

Figura 2 - Esquema representativo do desenho experimental. 1) Registro eletrofisiológico de 15 minutos em campo aberto; 2) Infusão intra-hipocampal de veículo (VEH) ou lactacistina (LAC); 3) Registro pós-infusão por 120 minutos.

Figura 3 - Variação da potência espectral no hipocampo após inibição da degradação proteica. Dados de potência para os grupos veículo (VEH, N=5) e lactacistina (LAC, N=5), normalizados pelo período basal. *p

Figura 4 - Registros representativos do Potencial de Campo Local (LFP) demonstrando o impacto da Lactacistina na ritmicidade do sinal. Traçados de LFP de um animal do grupo VEH (A) e um do grupo LAC (B) nos períodos basal, 15-20 min e 2h pós-infusão.

Figura 5 - Análise tempo-frequência (espectrogramas) ilustrando a supressão seletiva da banda teta. Análise tempo-frequência para os grupos VEH(A) e LAC(B), demonstrando a atenuação da banda de potência na faixa teta (~8 Hz) no animal tratado com a droga.

CÓDIGO: SB1170

AUTOR: CAIAN MATOS DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: SIDARTA TOLLENDAL GOMES RIBEIRO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E EXPRESSÃO DO SONO EM OCTOPUS INSULARIS

Resumo

O conhecimento acerca da caracterização do sono durante os diferentes estágios de vida, suas consequências na aprendizagem e os efeitos da privação de sono em invertebrados ainda é um mistério. Diante disso, este projeto tem como principal objetivo a investigação e caracterização por meio de uma quantificação comportamental abrangente do sono da espécie *Octopus insularis*. Para isso, serão delimitadas três linhas complementares de investigação: investigar e descrever em detalhes comportamentalmente os estágios de sono de *O. insularis* em diferentes estágios de vida; compreender possíveis diferenças a depender da ontogenia desta espécie; e investigar se a privação de sono pode interferir no processo de aprendizagem, de modo que seja dependente de sono quieto e/ou ativo.

Palavras-chave: Sono, polvos, comportamento

TITLE: CHARACTERIZATION OF THE DEVELOPMENT AND EXPRESSION OF SLEEP IN OCTOPUS INSULARIS

Abstract

Knowledge about how sleep is expressed across the life span in invertebrates—its role in learning and the effects of sleep deprivation—remains largely unexplored. This project therefore aims to investigate and characterize the sleep of *Octopus insularis* through comprehensive behavioral quantification. Three complementary lines of inquiry are proposed: (i) to investigate and describe in detail the behavioral sleep stages of *O. insularis* at different life stages; (ii) to identify possible ontogenetic differences in these stages; and (iii) to examine whether sleep deprivation alters learning performance, with a focus on the specific contributions of quiet and/or active sleep.

Keywords: Sleep, octopuses, behavior

Introdução

O sono é um estado recorrente de redução da atividade motora e sensorial, distinto da vigília por padrões eletrofisiológicos e comportamentais que asseguram homeostase, consolidação de memórias e autorregulação emocional (Rattenberg 2022; Greenspan et al. 2001). Para ser reconhecido como sono, um organismo deve exibir postura estereotipada ou espécie-específica, quiescência sustentada, elevação reversível do limiar de resposta e rebote após

privação (Campbell & Tobler 1984; Hendricks et al. 2000; Greenspan, Tononi, Cirelli & Shaw 2001; Meisel, Byrne, Mather & Kuba 2011). Ainda que esses critérios estejam consolidados para mamíferos e aves, evidências sólidas em invertebrados surgiram apenas recentemente (Rattenborg & Ungurean 2022). Entre elas destacam-se um estágio análogo ao REM em aranhas saltadoras (Rößler et al. 2022) e a alternância de sono quieto e ativo em *Octopus insularis* (Medeiros et al. 2021). A larga dispersão filogenética desses registros sugere que as bases neurofisiológicas do sono podem ter evoluído há cerca de 740 milhões de anos (Keene 2018; Rattenborg 2022), antecedendo a radiação dos vertebrados e tornando-o um fenômeno fundamental para a vida animal.

Os cefalópodes apareceram no Cambriano (~530 Ma) e, na subclasse Coleoidea, os octópodes desenvolveram um sistema nervoso centralizado com lobos discretos, como o complexo vertical associado à aprendizagem visual (Brown et al. 2006). Essa organização sustenta camuflagem dinâmica, comunicação cromática refinada, navegação de retorno à toca e múltiplas modalidades de aprendizagem. No clássico experimento de discriminação visual, polvos condicionados evitavam atacar caranguejos apresentados com uma placa metálica aversiva, mas mantinham o ataque quando o crustáceo era exibido isoladamente (Boycott & Young 1954). Memória espacial manifesta-se na ocupação prolongada de tocas e na evitação de áreas já exploradas em buscas anteriores por alimento (Mather, Anderson & Wood 2010). Aprendizagem por observação foi demonstrada quando indivíduos copiaram escolhas de um conspecífico previamente treinado, evidenciando transmissão social de informação (Fiorito & Scotto 1992; Frank 2012).

Em *O. vulgaris* identificaram-se dois lobos adicionais—subfrontal e frontal inferior—relacionados a processamento quimio-tátil e à modulação elétrica seletiva durante repouso, compatível com estados de sono (Brown et al. 2006; Gutnick 2020). Supõe-se que tais adaptações derivem do estilo de vida bentônico e do uso exploratório dos braços, exigindo integração sensorial complexa (Hanlon & Messenger 1996). No eixo ontogenético, paralarvas de *O. insularis* já exibem comportamentos homólogos aos estágios de sono adultos (dados inéditos). Em *O. vulgaris*, o cérebro origina-se de uma zona neurogênica periorbital e apresenta em miniatura todos os lobos da configuração adulta, permitindo rastrear a maturação funcional do sono (Styfahls et al. 2022).

Diante desse panorama, a presente pesquisa visa aprofundar o conhecimento do sono e da aprendizagem em *O. insularis*. Pretende-se descrever minuciosamente os estágios de sono em diferentes fases de vida, comparar variações ontogenéticas e testar se a privação direcionada de sono quieto ou ativo compromete o desempenho em tarefas de aprendizagem, fornecendo pistas sobre sua função adaptativa.

A abordagem reunirá filmagem infravermelha contínua, rastreamento automático de postura e registros eletrofisiológicos nos lobos supraesofágicos. Métricas ciclo-a-ciclo (duração, frequência, assimetria) serão ligadas ao limiar de resposta aferido por estímulos mecânicos padronizados. Após privação seletiva de sono quieto ou ativo, os polvos farão testes de discriminação visual para medir impactos cognitivos. Esse desenho integrativo deverá elucidar como diferentes estágios de sono influenciam a plasticidade comportamental e oferecer novos indícios sobre a trajetória evolutiva desse fenômeno em linhagens distantes.

Metodologia

Os polvos da espécie *O. insularis* serão coletados em Pirangi, Parnamirim/RN, Brasil, e mantidos individualmente em tanques de vidro de 1,0 x 0,7 x 0,6 m. Os animais serão gravados por 24 horas, durante o período de luz, com câmeras full HD colocadas fora do tanque, com spots infravermelho para o monitoramento na fase escura, possibilitando uma quantificação mais precisa dos episódios de sono. Todos os animais serão expostos a um ciclo claro/escuro de 12/12h e aclimatados ao laboratório por pelo menos 10 dias, seguidos de 4 dias de controle, sem nenhum novo estímulo. Em seguida, será iniciada a tarefa de aprendizagem das “bonecas russas”, modelo que consiste na tarefa de abrir potes, proposto inicialmente por Mather (2010), e serão privados de sono por estímulo tátil nos dias que seguem a tarefa. Posteriormente, as gravações de vídeo são analisadas para descrever o comportamento do sono e quantificar o tempo que os polvos gastavam abrindo os potes, bem como analisar os episódios de sono.

A tarefa chamada "bonecas russas" exige que os animais abram sequencialmente até 3 frascos diferentes, um dentro do outro, um menor que o outro, com uma recompensa (peixe, siri, caranguejo ou camarão) dentro do frasco menor. Os primeiros 4 dias de experimento são feitos testes com o pote menor (pote 1), nos próximos 4 dias seguintes é adicionado o pote médio (pote 2) e em seguida, por mais 4 dias, é aplicada a tarefa inserindo também o pote maior (pote 3). Cada pote fica na água por até no máximo 1 hora, caso o animal não abra o pote, este é retirado da água. Após o processo de experimentação, as gravações dos vídeos são analisadas para descrever o comportamento e quantificar: (1) quanto tempo o animal leva para ir até o pote (latência), (2) se abrem não os potes e (3) quanto tempo os animais gastam para abrir os potes a cada dia.

Para monitoramento do sono, os animais serão acompanhados pelo intervalo de 20 dias de forma contínua, por gravação de vídeo, durante a fase clara e escura. A privação será feita através de estímulo tátil durante os episódios de sono ativo.

Após a fase de controle (4 dias), serão realizados 2 (dois) dias de privação, dentre os 4 primeiros dias da tarefa com o pote 1 (frasco pequeno). Em seguida, serão feitos mais 2 (dois) dias de privação durante os 4 dias da tarefa com os pote 1 e 2 (frasco pequeno dentro do médio). Posteriormente, serão realizados mais 2 dias de privação na etapa final da tarefa, durante os 4 dias com os potes 1, 2 e 3 (frasco pequeno dentro do médio, ambos dentro do grande).

Resultados e Discussões

O estudo busca descrever e quantificar o desenvolvimento dos polvos da espécie *O. insularis*, que por ser um animal com ciclo de vida curto (em média um ano) será possível monitorar e acompanhar a variação entre os estágios em poucos meses. Sendo assim, acreditando que há diferença ontogenética entre os estágios da vida do animal, os animais juvenis deverão sofrer uma variação maior no ciclo sono-vigília durante a fase de privação. Além disso, visando determinar se o polvo se encaixa nos critérios de sono comportamental estabelecidos previamente em vertebrados, esperamos que os polvos assumam uma postura estereotipada e ocupem um lugar de descanso durante os ciclos de sono. Consequentemente, durante esses períodos, esperamos que eles exibam certas mudanças devido à quiescência associada ao sono de várias áreas do cérebro. Essas mudanças devem envolver movimentos periféricos do corpo e mudanças na aparência física devido à mudança de cor, descritas no sono ativo por Medeiros et al. (2021). Esperamos ainda que os animais tenham um limiar de excitação

elevado durante a quiescência e mostrem reversibilidade de estado com estimulação. Consequentemente, devido aos mecanismos de controle homeostático, esperamos que a privação durante a etapa da tarefa de aprendizagem leve a um rebote de repouso (Campbell & Tobler, 1984), além de um pior desempenho na tarefa.

Conclusão

Com base na investigação proposta, espera-se que este estudo forneça contribuições fundamentais para a neuroetologia e a biologia do sono. A confirmação dos critérios comportamentais de sono em *Octopus insularis* em diferentes fases ontogenéticas consolidará os cefalópodes como modelos válidos para o estudo da evolução do sono. A caracterização detalhada do desenvolvimento dos estágios de sono preencherá uma lacuna crítica no entendimento de como este estado comportamental se manifesta e se modifica desde a vida planctônica até a bentônica. Além disso, ao demonstrar uma possível relação causal entre a privação de sono ativo e prejuízos na aprendizagem complexa, a pesquisa oferecerá evidências robustas de que a função de consolidação da memória é uma propriedade ancestral e central do sono, possivelmente remontando a mais de 500 milhões de anos. Os resultados não apenas avançarão o conhecimento em um campo emergente, mas também estabelecerão um paradigma metodológico para estudos futuros com invertebrados, reforçando a importância de se investigar processos cognitivos complexos em linhagens evolutivas distantes dos vertebrados.

Referências

- Anderson, R.C.; Mather, J.A. It's all in the cues: Octopuses (*Enteroctopus dofleini*) learn to open jars, 2010.
- Brown, E. R., Piscopo, S., De Stefano, R., Giuditta, A. (2006). Brain and behavioural evidence for rest-activity cycles in *Octopus vulgaris*. *Behav Brain Res.*, 172, 355-9.
- Campbell, S. S., Toblew, I. (1984). Animal Sleep: A review of sleep duration across phylogeny. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 8, 269-300.
- Greenspan, R. J., Tononi, G., Cirelli, C., Shaw, P. J. (2001). Sleep and the fruit fly. *Trends Neurosci* 24(3),142-145.
- Gutnick, T., Zullo, L., Hochner, B., & Kuba, M. J. (2020). Use of Peripheral Sensory Information for Central Nervous Control of Arm Movement by *Octopus vulgaris*. *Current Biology*. doi:10.1016/j.cub.2020.08.037
- Hanlon, R. T., Messenger, J. B. (1998). *Cephalopod Behaviour*. Cambridge: Cambridge University Press.

Hendricks, J. C., Finn, S. M., Panckeri, K. A., Chavkin, J., Williams, J. A., Sehgal, A., & Pack, A. I. (2000). Rest in *Drosophila* Is a Sleep-like State. *Neuron*, 25(1), 129–138.

Keene, A. C., & Duboue, E. R. (2018). The origins and evolution of sleep. *The Journal of Experimental Biology*, 221(11), jeb159533. doi:10.1242/jeb.159533

Liscovitch-Brauer, N., Alon, S., Porath, H. T., Elstein, B., Unger, R., Ziv, T., Admon, A., Levanon, E. Y., Rosenthal, J. J. C., Eisenberg, E. (2017). Trade-off between transcriptome plasticity and genome evolution in cephalopods. *Cell* 169, 191–202.e11.

Mather, Jennifer A.; Andeson, Roland C.; Wood, James B.. *Octopus: the ocean's intelligent invertebrate*. Londres: Timber Press, 2010.

Medeiros, S. L. S., Paiva, M. M. M., Lopes, P. H., Blanco, W. L., Dantas, F., Oliveira, J. B. C., Medeiros, I. G., Sequerra, E. B., Souza, S. Leite, T. S., Ribeiro, S. G. (2020). Evidence of Sleep Cycle Analogous to Vertebrate SWS/REM Alternation in the Octopus. Disponível em SSRN: <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3640822>.

Meisel, D. V., Byrne, R. A., Mather, J. A., Kuba, M. (2011). Behavioral sleep in *Octopus vulgaris*. *Vie et Milieu* 61(4), 185-190.

Nitz, D. A., Van, S. B., Tononi, G., Greenspan, R. J. (2002). Electrophysiological correlates of rest and activity in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol*, 12(22), 1934-40.

Ramon, F., Hernandez-Falcon, J., Nguyen, B., Bullock, T. H. (2004). Slow wave sleep in crayfish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 11857–61.

Rattenborg, N. C., & Ungurean, G. (2022). The evolution and diversification of sleep. *Trends in Ecology & Evolution*.

Röbller, D. C., Kim, K., De Agrò, M., Jordan, A., Galizia, C. G., & Shamble, P. S. (2022). Regularly occurring bouts of retinal movements suggest an REM sleep-like state in jumping spiders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(33), e2204754119.

Styfhals, Ruth et al. Cell type diversity in a developing octopus brain. *Nature Communications*, [s. l.], 30 nov. 2022 DOI:

<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41467-022-35198-1>.

CÓDIGO: SB1280

AUTOR: MARINA DE MORAES CARRILHO

COAUTOR: ANA MANHANI CACERES

COAUTOR: CLAUDIA LETÍCIA DE LIMA DANTAS

ORIENTADOR: DANIEL YASUMASA TAKAHASHI

TÍTULO: Testando o aprendizado estatístico multimodal da categorização acústica

Resumo

Introdução: A percepção da fala é influenciada pelas diferenças linguísticas e pela aprendizagem estatística, sendo potencializada por pistas visuais que favorecem a categorização acústica. A psicofísica oferece meios para investigar como estímulos auditivos e visuais interagem nessa percepção. **Objetivo:** Investigar a influência de pistas visuais na categorização de sons. **Metodologia:** Foi elaborada uma tarefa psicofísica do tipo oddball, implementada no PsychoPy. A fase de habituação constituiu-se utilizando vocalizações de saguis associadas a figuras geométricas de forma consistente ou inconsistente. Ademais, o teste oddball foi elaborado para que somente os estímulos auditivos fossem apresentados. **Resultados:** A habituação mostrou-se viável em ambas as condições. A primeira versão do teste, com 120 blocos de vocalizações, revelou alta complexidade. Após ajustes, a versão final adotou oito vocalizações em 24 blocos repetidos em cinco loops, resultando em cerca de 30 minutos de duração do experimento, com a possibilidade de maior engajamento e registro automatizado de desempenho. **Conclusão:** O experimento está pronto para aplicação. Espera-se que associações audiovisuais consistentes ampliem a categorização acústica, reforçando o papel do aprendizado estatístico e incentivando novas pesquisas em diferentes contextos linguísticos.

Palavras-chave: Psychopy. Python. Categorização acústica.

TITLE: Testing multimodal statistical learning of acoustic categorization

Abstract

Introduction: Speech perception is influenced by linguistic differences and statistical learning, and is enhanced by visual cues that favor acoustic categorization. Psychophysics provides a means to investigate how auditory and visual stimuli interact in this perception. **Objective:** To investigate the influence of visual cues on sound categorization. **Methodology:** An oddball psychophysical task was developed and implemented in PsychoPy. The habituation phase consisted of using marmoset vocalizations associated with geometric figures in a consistent or inconsistent manner. In addition, the oddball test was designed so that only auditory stimuli were presented. Results: Habituation proved feasible in both conditions. The first version of the test, with 120 blocks of vocalizations, revealed high complexity. After adjustments, the final version adopted eight vocalizations in 24 blocks

repeated in five loops, resulting in an experiment lasting about 30 minutes, with the possibility of greater engagement and automated performance recording. **Conclusion:** The experiment is ready for application. Consistent audiovisual associations are expected to broaden acoustic categorization, reinforcing the role of statistical learning and encouraging further research in different linguistic contexts.

Keywords: Psychopy. Python. Acoustic Categorization.

Introdução

A percepção da fala é moldada pelas diferenças entre línguas, que delimitam contrastes sonoros relevantes e orientam a forma como categorias fonéticas são aprendidas (ZHAO; KUHL; ZATORRE, 2018). Nesse contexto, estudos mostram que as pessoas não apenas reconhecem unidades sonoras específicas, mas também se apoiam em elementos frequentes para segmentar e atribuir funções gramaticais. De acordo com Frost, Monaghan e Christiansen (2016), palavras de alta frequência auxiliam tanto a segmentação da fala quanto a formação de categorias, evidenciando que a aquisição linguística está ancorada em propriedades estatísticas do input. Sendo assim, pode-se afirmar que as diferenças linguísticas não apenas moldam o espaço perceptual disponível aos falantes, mas também interagem com mecanismos estatísticos que permitem a extração de regularidades do fluxo da fala.

Nesse sentido, a aprendizagem estatística se mostra um mecanismo central para a detecção de regularidades na fala e em outros domínios perceptivos. Embora a sensibilidade às probabilidades de transição permita prever ocorrências em sequências, essa capacidade não garante, por si só, a formação de representações duradouras (ENDRESS; SLONE; JOHNSON, 2020). Além disso, fatores como modalidade, tipo de apresentação e domínio influenciam diretamente a detecção de padrões, o que mostra a flexibilidade desse processo (LUKICS; LUKÁCS, 2022). Ademais, a integração multimodal potencializa o aprendizado, já que estímulos audiovisuais aumentam a precisão na categorização fonética em comparação aos auditivos isolados (ZHI; LEVY; MEYLAN, 2024). Assim, a aprendizagem estatística revela-se dinâmica e dependente tanto das propriedades do estímulo quanto da interação entre modalidades sensoriais.

Com base nisso, a psicofísica oferece ferramentas para investigar como propriedades físicas de estímulos se relacionam com experiências perceptivas (DULAY et al., 2024). No campo da linguagem, essa abordagem permite medir de forma controlada a sensibilidade a variações acústicas mínimas e entender como tais diferenças são categorizadas pelos ouvintes (GETZ; TOSCANO, 2020). Além disso, sua aplicação a contextos multimodais revela que pistas visuais podem modificar a percepção auditiva, como demonstrado em experimentos com bebês de nove meses que passaram a discriminar contrastes fonéticos não nativos quando os sons eram consistentemente associados a objetos distintos (YEUNG; WERKER, 2009). Dessa forma, a psicofísica contribui para compreender de que maneira a integração entre modalidades sensoriais influencia a categorização da fala. Sendo assim, é possível identificar a relevância de outras modalidades sensoriais, especificamente a visual, para a categorização acústica que facilita a distinção e agrupamento de sons semelhantes.

O presente estudo tem como objetivo investigar a influência de pistas visuais na categorização de sons. Para tanto, será implementada uma tarefa psicofísica do tipo oddball em PsychoPy, permitindo analisar se a consistência das associações audiovisuais impacta a acurácia e o tempo de reação dos participantes na discriminação de estímulos acústicos.

Metodologia

Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (HUOL/UFRN), parecer 7.059.854. Todos os participantes assinarão um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Participantes

A pesquisa contará com a participação de 50 participantes voluntários (25 homens e 25 mulheres), saudáveis e com idade entre 18 a 50 anos. Com base nisso, serão utilizados como critérios de exclusão: deficiência auditiva, deficiência visual, sensibilidade extrema e uso de psicoativos ou diagnósticos psiquiátricos.

Psicofísica

A Psicofísica é a ciência que está centralizada no estudo da interação métrica entre as dimensões físicas e as dimensões subjetivas decorrentes destas. Nesse sentido, a especificidade que fundamenta esta ciência, é o próprio homem como instrumento de medida. Os processos e técnicas psicofísicas, centrados no ser humano, permitem o alcance de medidas de altíssima precisão, quando o método é aplicado adequadamente (COSTA, 2017).

Habituação

A etapa de habituação foi delineada para ser realizada de duas formas distintas, ambas implementadas no programa Psycopy e com duração média de aproximadamente 10 minutos. Na primeira condição, 8 vocalizações distintas de saguis foram associadas de forma consistente a 8 figuras geométricas diferentes: retângulo, triângulo, círculo, trapézio, paralelogramo, losango, pentágono e hexágono. Na segunda condição, utilizou-se as mesmas 8 vocalizações e as mesmas figuras, entretanto, uma única figura poderá ser associada a duas ou mais vocalizações, ou seja, sem associação consistente. Sendo assim, utilizaremos a amplitude média de 65dB para execução dos estímulos sonoros.

Projeto Experimental e Procedimento - Teste de Oddball

Tendo em vista a relevância da caracterização dos sons produzidos durante a fala como um dos principais parâmetros para distinção entre as diferentes línguas, temos como objetivo testar a função de estímulos visuais na caracterização dos sons por meio de uma tarefa de psicofísica.

Para elaboração dos dados da tarefa, o software utilizado foi o PsychoPy, que possui uma diversidade de códigos disponíveis, possibilitando o desenvolvimento da prática planejada, como também é uma ferramenta gratuita (GALVÃO, 2021).

Dessa forma, a estruturação do teste de oddball ocorreu em etapas sucessivas, a partir de um delineamento inicial. Na primeira versão da tarefa, o experimento consistia em 120 blocos, cada um com duração aproximada de 30 segundos. Em cada bloco, eram apresentados quatro estímulos sonoros em sequência: três estímulos sonda idênticos, seguidos de um estímulo teste, que poderia ser igual ou diferente. Dessa forma, a tarefa do participante seria indicar, por meio do teclado, se o estímulo teste era igual ao estímulo sonda anterior utilizando tecla

“s” ou diferente utilizando a tecla “d”. Além disso, cada bloco era identificado em sequência, contendo a indicação de início e o período de resposta, intitulado como “teste”, o que delimitava o fim do bloco. Entretanto, verificou-se que as vocalizações utilizadas nessa versão tornavam a tarefa extremamente difícil para análise das vocalizações e manutenção do foco.

Diante dessa limitação, implementou-se uma segunda versão, substituindo os estímulos por vocalizações menos complexas. Nesse formato, foram utilizadas 29 vocalizações distintas para a composição dos 120 blocos, foram construídos 60 blocos executados 2 vezes seguidas de forma sequencial. Além disso, incluiu-se um sinal visual para marcar o início de cada bloco, um quadrado azul exibido na tela por 2 segundos. Em seguida, as vocalizações eram apresentadas sequencialmente, cada uma com 2 segundos de duração, no mesmo arranjo de três estímulos sondas seguidos pelo estímulo teste, com duração de 2 segundos. No momento da apresentação do estímulo-teste, era exibido simultaneamente um quadrado amarelo, também por 2 segundos. Ao término desse intervalo, o participante deveria responder, pressionando a tecla “s” caso o estímulo fosse igual ou a tecla “d” caso fosse diferente em relação ao estímulo sonda. Caso não houvesse resposta dentro de 3 segundos, exibia-se um quadrado vermelho por 2 segundos e imediatamente o próximo bloco se iniciava automaticamente.

Por fim, para equilibrar a incidência das vocalizações e otimizar a duração total do experimento, o número de estímulos foi reduzido de 29 para 8 vocalizações. Essa alteração permitiu maior controle sobre a distribuição dos estímulos e reduziu o tempo médio de cada bloco para cerca de 16 segundos, resultando em uma duração total do experimento de aproximadamente 30 minutos. A estrutura dos blocos foi mantida, contudo, foram construídos 24 blocos, executados em 5 loops sequenciais e, para contabilizar a acurácia e o tempo de reação de cada participante.

Resultados e Discussões

O desenvolvimento da etapa de habituação mostrou-se funcional nas duas condições implementadas no PsychoPy. Na primeira, cada vocalização foi associada a uma figura geométrica distinta, o que favoreceu a criação de correspondências estáveis entre modalidades auditiva e visual. Por outro lado, na segunda condição, as associações foram inconsistentes, de modo que uma mesma figura poderia estar relacionada a diferentes vocalizações. Assim, a possibilidade de manipular esses dois arranjos de forma controlada constitui um avanço importante, permitindo avaliar, em etapas posteriores, como a consistência das associações influencia a formação de categorias acústicas. Além disso, o tempo médio de execução (cerca de 10 minutos) confirmou a viabilidade dessa fase, sendo possível manter o engajamento dos participantes sem sobrecarregá-los.

No que se refere ao teste oddball, o programa revelou-se eficaz na geração de sequências experimentais. Entretanto, a primeira versão, composta por 120 blocos de vocalizações dissílabas, indicou que a complexidade dos estímulos dificultava tanto a análise das respostas quanto a manutenção da atenção. Desse modo, esse resultado foi determinante para a formulação de uma segunda versão.

Na etapa seguinte, com a adoção de vocalizações monossilábicas e a inclusão de sinais visuais (azul para início do bloco, amarelo para estímulo teste e vermelho para ausência de

resposta), observou-se maior clareza no andamento do experimento e melhor sincronização entre os estímulos auditivos e visuais. Ainda que essa versão apresentasse duração prolongada, os ajustes evidenciaram a flexibilidade do protocolo e sua capacidade de integração multimodal.

Posteriormente, a versão final trouxe maior equilíbrio entre controle experimental e tempo de execução. A redução do número de estímulos para oito vocalizações monossílabas e a reorganização em 24 blocos repetidos em cinco loops resultaram em um tempo total aproximado de 30 minutos, com duração média de 16 segundos por bloco. Com isso, foi possível otimizar a tarefa, reduzir a fadiga e possibilitar a qualidade dos dados que serão coletados. Além do mais, o registro automático de acurácia e tempo de reação proporcionará a robustez metodológica, garantindo condições adequadas para investigações psicofísicas posteriores.

Além disso, a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa marcou um passo fundamental na consolidação do estudo, viabilizando a transição para a próxima etapa experimental, uma vez que o experimento está pronto, será possível coletar os dados com participantes e reforçar a legitimidade científica e ética da tarefa desenvolvida.

Conclusão

Uma vez que o experimento está pronto para ser implementado, esperamos testar o papel de pistas visuais na categorização de sons e observar nos participantes um maior desempenho nos blocos onde houve inicialmente uma habituação com associação consistente entre as imagens e as vocalizações de saguis. Ou seja, de acordo com a hipótese em que exista uma relação entre a associação estatística e os estímulos acústicos e visuais, espera-se que isso fortaleça a capacidade de categorização dos indivíduos.

Logo, a confirmação destes resultados fornecerá fortes evidências de que o aprendizado estatístico audiovisual é um fator importante na classificação acústica, mesmo em adultos. Ademais, os resultados podem desencadear novas pesquisas para investigar como as associações estatísticas contribuem para a formação de categorias acústicas em diferentes contextos linguísticos.

Referências

COSTA, M. F. Manual Didático de Teoria e Prática de Psicofísica. 2017.

DULAY, J.; POLTORATSKI, S.; HARTMANN, T. S.; ANTHONY, S. E.; SCHEIRER, W. J. Informing machine perception with psychophysics [Point of view]. Proceedings of the IEEE, v. 112, n. 2, p. 88-96, fev. 2024. DOI:<https://doi.org/10.1109/JPROC.2024.3380905>.

ENDRESS, Ansgar D.; SLONE, Lauren K.; JOHNSON, Scott P. Statistical learning and memory. Cognition, v. 204, p. 104346, 2020. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cognition.2020.104346>.

GALVÃO, Henrique de Almeida. Treinamento de Velocidade na Tarefa de Reconhecimento de Símbolos Presentes na Notação Musical a partir do Uso de Discriminação Condicional. 2021. Dissertação (Mestrado em Psicologia: Cognição e Comportamento) – Faculdade de

Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/46935>.

GETZ, L.; TOSCANO, J. The time-course of speech perception revealed by temporally-sensitive neural measures. Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science, e1541, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/wcs.1541>.

LUKICS, Krisztina Sára; LUKÁCS, Ágnes. Modality, presentation, domain and training effects in statistical learning. Scientific Reports, v. 12, art. 20878, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24951-7>.

ZHAO, T.; KUHL, P.; ZATORRE, R. Linguistic effect on speech perception observed at the brainstem. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 115, p. 8716-8721, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1800186115>.

ZHI, Sophia; LEVY, Roger P.; MEYLAN, Stephan C. Multimodal Input Aids a Bayesian Model of Phonetic Learning. arXiv preprint, 22 jul. 2024. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/2407.15992>.

CÓDIGO: SB1317

AUTOR: BEATRIZ CAROLINE DE ALCANTARA SABO

ORIENTADOR: DRAULIO BARROS DE ARAUJO

TÍTULO: Avaliação da fotodegradação e perfil de estabilidade da N,N-Dimetiltriptamina (DMT) sob diferentes condições.

Resumo

A N,N-Dimetiltriptamina (DMT) é um alcaloide psicodélico com potencial terapêutico promissor, especialmente no tratamento de transtornos psiquiátricos como a depressão resistente. No entanto, a ausência de dados sobre sua estabilidade e susceptibilidade à fotodegradação compromete o desenvolvimento de formulações seguras e eficazes. Este projeto avaliou a estabilidade de soluções de DMT sob duas condições de armazenamento: exposição à luz em câmara de fotodegradação a 25 °C e proteção da luz a 20 °C, nos tempos de 0h, 2h, 4h, 24h, 48h e 72h. A concentração de DMT após exposição às diferentes condições foi conduzida no GC-MS, com base em protocolos padronizados. Diante dos experimentos realizados, é possível afirmar que a DMT diluída em metanol (MeOH), na condição ausência de luz sob congelamento (~-20°C), é estável por 72h, tempo máximo analisado, de forma consistente e segura mas é necessário a continuidade do andamento da pesquisa para responder às questões centrais em relação ao comportamento da DMT sob diferentes condições de armazenamento e os seus impactos, contribuindo para a confiabilidade de estudos clínicos com psicodélicos com rigor metodológico na pesquisa com DMT.

Palavras-chave: N,N-Dimetiltriptamina. Estabilidade. Fotodegradação. Psicodélicos.

TITLE: Evaluation of Photodegradation and Stability Profile of N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Under Different Conditions

Abstract

N,N-Dimethyltryptamine (DMT) is a psychedelic alkaloid with promising therapeutic potential, particularly in the treatment of psychiatric disorders such as treatment-resistant depression. However, the lack of data on its stability and susceptibility to photodegradation compromises the development of safe and effective formulations. This project evaluated the stability of DMT solutions under two storage conditions: exposure to light in a photodegradation chamber at 25 °C and protection from light at 20 °C, at the time points 0h, 2h, 4h, 24h, 48h, and 72h. DMT concentration after exposure to the different conditions was determined using GC-MS, based on standardized protocols. From the experiments conducted, it can be stated that DMT diluted in methanol (MeOH), under light-protected freezing conditions (~-20 °C), remains stable for 72h—the maximum time analyzed—in a consistent and reliable manner. Nevertheless, further research is required to address central questions regarding the behavior of DMT under different storage conditions and their impacts, thereby

contributing to the reliability of clinical studies with psychedelics and ensuring methodological rigor in DMT research.

Keywords: N,N-Dimethyltryptamine. Stability. Photodegradation. Psychedelics.

Introdução

A N,N-Dimetiltriptamina (DMT) é um alcaloide indólico psicodélico presente em algumas plantas como a Jurema-preta (*Mimosa hostilis*), planta nativa da caatinga do Nordeste brasileira, e a Chacrona (*Psychotria viridis*), assim como, em animais, incluindo os seres humanos, que vem obtendo destaque e desempenhando papel emergente em estudos clínicos que investigam novas abordagens terapêuticas para transtornos psiquiátricos, como a depressão resistente ao tratamento (BARKER, 2018; CARBONARO; GATCHCh, 2016).

Seu uso é de origem ancestral e tradicional estando presente em bebidas como a ayahuasca e a jurema sagrada utilizada em contextos indígenas e religiosos mas que passou a despertar crescente interesse científico especialmente pela eficácia preliminar observada em estudos clínicos controlados voltados aos transtornos psiquiátricos (MCKENNA; TOWERS; ABBOTT, 1984) diante da sua ação farmacológica fortemente associada à ativação de receptores serotoninérgicos, principalmente 5-HT_{2A}, que são os responsáveis por trazer efeitos subjetivos intensos e de curta duração que revelam efeitos antidepressivos rápidos e com perfil de segurança aceitável como vem sendo mostrado por pesquisas inovadoras realizadas no Instituto do Cérebro (ICe/UFRN) com essa substância, tanto de forma, e especialmente isolada (FALCHI-CARVALHO, M., PALHANO-FONTES, F., WIESSNER, I. ET AL), quanto pela bebida ayahuasca (PALHANO-FONTES et al., 2019).

Entretanto, apesar do avanço das pesquisas clínicas envolvendo a DMT, aspectos fundamentais relacionados às suas propriedades físico-químicas ainda são pouco explorados. Entre eles, destaca-se a ausência de dados sistemáticos sobre sua estabilidade frente a fatores ambientais como luz, temperatura e tempo de armazenamento. A fotodegradação, em particular, pode comprometer a integridade da substância, reduzindo sua eficácia farmacológica e dificultando a reprodutibilidade de experimentos e ensaios clínicos (KUMAR; SINGH, 2021). Tais limitações representam um obstáculo significativo para o desenvolvimento de formas farmacêuticas estáveis e padronizadas contendo DMT, sobretudo considerando sua possível aplicação terapêutica em contextos regulados.

A realização de estudos de estabilidade é uma etapa essencial no desenvolvimento de qualquer fármaco (AZMI; HASHIM, 2020) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa por meio de RDC 318/2019 estabelece critérios para a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos (IFAs) quando se trata de medicamentos inovadores e específicos (ANVISA, 2018). Neste contexto, o presente projeto propõe a investigação sistemática e inédita da estabilidade e fotodegradação da DMT, proveniente da extração de DMT das raízes da planta *Mimosa tenuiflora* (Jurema-Preta), em diferentes condições de armazenamento e ao longo de intervalos de tempo específicos.

Os dados obtidos contribuem significativamente para o avanço da pesquisa com psicodélicos no Brasil, oferecendo suporte técnico-científico para o desenvolvimento de medicamentos inovadores, aprimoramento dos protocolos experimentais, assegurando a qualidade das formulações empregadas em pesquisas clínicas e reforçando a credibilidade das abordagens terapêuticas baseadas na DMT.

Metodologia

CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)

As análises de GC-MS foram realizadas utilizando um cromatógrafo gasoso Agilent 8860 acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolo único Agilent 5977C GC-MSD (Agilent, Stockport, Reino Unido). O amostrador automático foi equipado com uma seringa de 10 μL . A seringa passou por dois e dez ciclos de limpeza com isopropanol antes e depois da injeção, respectivamente. A amostra foi bombeada seis vezes antes de injetar 1 μL . A taxa de enchimento da seringa foi de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. A coluna HP-5ms (30 m, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 μm de espessura de filme, Agilent, Stockport, Reino Unido) foi utilizada nas análises com fluxo de gás hélio de 1,2 mL/min. A linha de entrada da coluna foi mantida a 80 $^{\circ}\text{C}$ e o modo de injeção splitless foi escolhido. O forno foi mantido a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos e em seguida a temperatura foi elevada a uma taxa de 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 200 $^{\circ}\text{C}$ e depois de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 280 $^{\circ}\text{C}$, onde permaneceu por 4 minutos. A linha de transferência foi mantida a 280 $^{\circ}\text{C}$. O espectrômetro de massas foi operado em modo de ionização eletrônica com temperatura do quadrupolo a 150 $^{\circ}\text{C}$, temperatura da fonte a 230 $^{\circ}\text{C}$ e energia de 70 eV. O espectro de massa foi coletado entre 50 e 500 m/z, com período de aquisição de 0 a 32,5 minutos. O software MassHunter (Agilent, Stockport, Reino Unido) foi utilizado para análise de dados e controle de equipamentos. A resposta foi avaliada com base na área do pico identificado nos cromatogramas de contagem total de íons (TIC, do inglês Total Ion Chromatogram). A identificação do analito foi feita por comparação com o tempo de retenção do padrão e comparação com a biblioteca espectral do NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, EUA).

ENSAIOS DE FOTOESTABILIDADE

O modelo experimental para avaliação e determinação da estabilidade e fotodegradação da DMT foi primeiro realizado com a pesagem de 10 mg de DMT e diluído a 10 mL de metanol (MeOH), assim como, em acetonitrila, hexano e dimetilsulfóxido (DMSO). Depois, foi adicionado 1 mL em vials diferentes para os tempos 0h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h e 72h nas condições ausência de luz sob congelamento ($\sim 20^{\circ}\text{C}$) e em exposição à luz em câmara (com temperatura controlada $\sim 25^{\circ}\text{C}$), como esquematizado na Figura 1.

Em um segundo experimento, foi realizado a pesagem diretamente em vials da quantidade de 1 mg da DMT em pó e as amostras foram colocadas nas seguintes condições novamente de exposição à luz em câmara (com temperatura controlada $\sim 25^{\circ}\text{C}$), ausência de luz sob congelamento ($\sim 20^{\circ}\text{C}$). Para a análise, cada amostra foi diluída em metanol (MeOH) após a exposição e somente no momento da leitura. Cada amostra foi coletada e analisada nos seguintes intervalos de tempo: 0h, 2h, 4h, 24h, 48h e 72h, conforme esquema da Figura 2.

Para cada ponto amostral, foram realizados os testes para determinação e quantificação da DMT, tanto diluída, quanto em pó pela técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Resultados e Discussões

Foram comparados acetonitrila, hexano, dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol (MeOH) conforme apresentado na Figura 3. Entre esses, o metanol (MeOH) apresentou o desempenho mais consistente, mantendo aproximadamente 70–75% da concentração inicial de DMT após 72 horas, quando armazenado sob congelamento ($\sim 20^{\circ}\text{C}$) e na ausência de luz. Diante desses resultados e considerando também aspectos de acessibilidade e compatibilidade analítica, o metanol (MeOH) foi escolhido como solvente para os experimentos subsequentes.

No primeiro experimento, avaliou-se a estabilidade da DMT diluída em metanol (MeOH) sob as duas condições contrastantes: (i) ausência de luz sob congelamento ($\sim 20^{\circ}\text{C}$) e (ii) exposição à luz em câmara (com temperatura controlada $\sim 25^{\circ}\text{C}$). Observou-se que, na ausência de luz e sob congelamento, a concentração de DMT permaneceu estável ao longo das 72 horas avaliadas, sem variações significativas. Em contrapartida, na condição de exposição à luz em câmara verificou-se degradação progressiva e acentuada, especialmente após 24 horas, resultando em aproximadamente 20% da concentração inicial ao final de 72 horas conforme apresentado na Figura 4.

A análise dos cromatogramas afirma esses achados: na condição de congelamento com proteção da luz, o pico característico da DMT (~ 20 minutos de tempo de retenção) manteve-se estável e intenso durante todo o período experimental (à esquerda). Já sob exposição à luz em câmara (à direita), observou-se redução gradual da área do pico principal, e o surgimento de picos adicionais em diferentes tempos de retenção, indicando formação de produtos de degradação, como mostrado na Figura 5.

No segundo experimento, investigou-se a estabilidade da DMT em sua forma em pó, seguindo as mesmas condições trazidas anteriormente: (i) ausência de luz sob congelamento ($\sim 20^{\circ}\text{C}$) e (ii) exposição à luz em câmara (com temperatura controlada $\sim 25^{\circ}\text{C}$). Os resultados revelaram oscilações nos tempos iniciais de análise, com variações inesperadas na concentração relativa, que podem decorrer de fatores instrumentais ou da própria instabilidade superficial do material sólido. Após 72 horas, entretanto, observou-se que, na condição de congelamento, a concentração residual de DMT foi de cerca de 86%, enquanto, sob exposição à luz, o valor manteve-se próximo de 89–90%, conforme apresentado na figura 6. Esse achado sugere que a DMT em pó pode apresentar comportamento distinto em relação à DMT diluída, o que demanda novos experimentos para elucidação e compreensão dos mecanismos envolvidos.

Conclusão

Embora a N,N-Dimetiltriptamina (DMT) venha sendo amplamente investigada por seu potencial terapêutico, especialmente em abordagens aplicadas aos transtornos psiquiátricos, ainda são escassos os dados sobre sua estabilidade físico-química em diferentes condições ambientais. A ausência de informações detalhadas sobre sua susceptibilidade à fotodegradação, bem como sobre os efeitos da exposição a variações de temperatura e luz, levanta uma série de questionamentos relevantes do ponto de vista farmacotécnico e clínico.

No momento, é possível afirmar que a DMT diluída em metanol (MeOH), na condição ausência de luz sob congelamento ($\sim 20^{\circ}\text{C}$), é estável por 72h, tempo máximo analisado, de forma consistente e segura. Assim como, afirma-se a necessidade de continuidade dos experimentos, também sob as condições refrigeração (4°C) e temperatura ambiente e busca por mais protocolos de estudos sobre a estabilidade e fotodegradação para que se possa

responder às questões centrais em relação ao comportamento da DMT sob diferentes condições de armazenamento e quais são os impactos dessas condições sobre sua concentração ao longo do tempo, especialmente para os contextos que exigem padronização e reprodutibilidade, como os ensaios clínicos propostos pelo grupo, trazendo maior confiabilidade de estudos clínicos com psicodélicos pelo fortalecimento de boas práticas laboratoriais e rigor metodológico na pesquisa com DMT.

Referências

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019, dispõe sobre os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília.

AZMI, N.; HASHIM, N. H. Stability studies of pharmaceutical products: An overview. *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 18, n. 1, p. 1–19, 2020.

BARKER, S. A. N,N-Dimethyltryptamine (DMT), an endogenous hallucinogen: Past, present and future research to determine its role and function. *Frontiers in Neuroscience*, v. 12, p. 536, 2018.

BLESSY, M. et al. Stability indicating methods—A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 4, n. 3, p. 159–165, 2014.

CARBONARO, T. M.; GATCH, M. B. Neuropharmacology of N,N-dimethyltryptamine. *Brain Research Bulletin*, v. 126, p. 74–88, 2016.

FALCHI-CARVALHO, M., PALHANO-FONTES, F., WIESSNER, I. et al. Rapid and sustained antidepressant effects of vaporized N,N-dimethyltryptamine: a phase 2a clinical trial in treatment-resistant depression. *Neuropsychopharmacol.* 50, 895–903 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41386-025-02091-6>

GARDNER, D. R.; RIET-CORREA, F; PANTER, K. E. (2011). Alkaloid profiles of *Mimosa tenuiflora* and associated methods of analysis. In: *Poisoning by plants, mycotoxins and related toxins*, 600–605.

GAUJAC, A. et al. Determination of N,N-dimethyltryptamine in beverages consumed in religious practices by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography ion trap mass spectrometry. *Talanta*, v. 106, p. 394–398, 2013.

KUMAR, M.; SINGH, R. Photo-degradation studies and stabilization strategies for pharmaceuticals: A review. *Current Pharmaceutical Analysis*, v. 17, n. 3, p. 271–282, 2021.

MCKENNA, D. J.; TOWERS, G. H. N.; ABBOTT, F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: Tryptamines and β -carbolines. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 10, n. 2, p. 195–223, 1984.

PALHANO-FONTES, F. et al. Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomized placebo-controlled trial. *Psychological Medicine*, v. 49, n. 4, p. 655–663, 2019. DOI: 10.1017/S0033291718001356.

Anexos

Figura 1: Esquema metodológico DMT diluída em (MeOH) antes da exposição.

Figura 2: Esquema metodológico DMT em pó.

Figura 3: Gráfico de desempenho dos solventes em condição exposição à luz e sem luz sob congelamento

Figura 4: Gráfico de desempenho DMT diluída em MeOH em condição exposição à luz (azul) e sem luz sob congelamento (amarelo)

Figura 5: Cromatogramas da DMT diluída em MeOH em condição ausência de luz sob congelamento (à esquerda) e exposição à luz (à direita)

Figura 6: Gráfico DMT em pó em condição ausência de luz sob congelamento (azul) e exposição à luz (vermelho)

CÓDIGO: SB1376

AUTOR: VIVIAN ANTONIELLY BECKER DOS SANTOS

ORIENTADOR: EDUARDO BOUTH SEQUERRA

TÍTULO: Investigação sobre a origem do padrão morfológico gerado em malformações cerebrais derivadas do vírus Zika

Resumo

A infecção do sistema nervoso central (SNC) fetal pelo vírus Zika (ZIKV) provoca inflamação e malformações, mas o papel da resposta imune nesse processo ainda não está totalmente esclarecido. Para investigar, analisamos o soro de pares de mães e filhos com microcefalia associada ao ZIKV, coletado quando as crianças tinham cerca de dois anos (692 ± 87 dias). Foram realizados ensaios ELISA com antígenos adsorvidos e extratos de astrócitos humanos em cultura para detectar autoanticorpos neurais. Observamos que parte das mães apresentou anticorpos contra ZIKV e também contra os quatro sorotipos do vírus da dengue, enquanto as crianças não foram imunizadas pela exposição intrauterina. Para explorar se houve resposta autoimune contra o SNC embrionário, avaliamos a proteína ENGRAILED1 (ENG-1), altamente expressa no rombencéfalo durante o desenvolvimento. As mães de crianças com síndrome congênita do Zika (SCZV) exibiram níveis aumentados de IgG e IgM anti-ENG-1, enquanto as crianças mostraram apenas IgM elevada. Testes adicionais, com ELISA comercial para autoanticorpos contra antígeno dos gânglios basais, revelaram níveis elevados de IgG em mães e filhos com SCZV. Entretanto, entre as crianças, não houve padrão consistente: diferentes indivíduos expressaram IgG ou IgM contra ENG-1, mas não ambas as classes. Esses achados indicam que parte das mães manteve memória imunológica da infecção viral no SNC fetal, evidenciada pela presença de autoanticorpos neurais persistentes.

Palavras-chave: Autoanticorpos. Resposta imune materna. Neuroimunologia

TITLE: Investigation on the origin of the morphological pattern generated in Zika virus-derived brain malformations

Abstract

The fetal central nervous system (CNS) infection by Zika virus (ZIKV) causes inflammation and malformations, but the role of the immune response in this process is not fully understood. To investigate, we analyzed serum from mother-child pairs with ZIKV-associated microcephaly, collected when children were about two years old (692 ± 87 days). ELISA assays with adsorbed antigens and cultured human astrocyte extracts were performed to detect neural autoantibodies. We observed that some mothers had antibodies against ZIKV and the four dengue virus serotypes, while children were not immunized by intrauterine exposure. To explore whether there was an autoimmune response against the embryonic CNS, we evaluated the ENGRAILED1 (ENG-1) protein, highly expressed in the developing rhombencephalon. Mothers of children with congenital Zika syndrome (CZS) showed increased levels of IgG and IgM anti-ENG-1, while children exhibited only elevated IgM.

Additional tests with a commercial ELISA for autoantibodies against basal ganglia antigens revealed high IgG levels in both mothers and children with CZS. However, among children, no consistent pattern was found: different individuals expressed either IgG or IgM against ENG-1, but not both. These findings suggest that some mothers retained immunological memory of the viral infection in the fetal CNS, evidenced by the persistence of neural autoantibodies.

Keywords: Autoantibodies. Maternal immune response. Neuroimmunology

Introdução

Em 2015, o Brasil, especialmente o Nordeste, registrou um aumento significativo nos casos de microcefalia em recém-nascidos, sendo posteriormente confirmada a relação com a epidemia de vírus Zika (ZIKV) (Calvet et al., 2016; França et al., 2016; Garcez et al., 2016). A infecção congênita por ZIKV compromete o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), originando a Síndrome Congênita do Vírus Zika (SCVZ). Pesquisadores da UFRN contribuíram para a descrição de alterações morfológicas encefálicas, eletrofisiológicas (Sequerra et al., 2020), cardiológicas (Arrais et al., 2021) e imunológicas (Anderson et al., 2021) nesses pacientes.

Embora o estado de emergência tenha sido encerrado, novos casos seguem sendo registrados. Em 2020, o último caso confirmado no RN ocorreu em 2018, mas boletins de 2021 indicaram 75 notificações de gestantes com suspeita de ZIKV, sendo 47 de Santa Cruz (SESAP-RN, 2021). Em setembro de 2021, nosso grupo examinou 20 gestantes e crianças na região. Uma criança apresentou microcefalia pós-natal. Das 15 mães que já haviam dado à luz, 8 tinham sorologia positiva para ZIKV; entre 5 grávidas, 3 apresentaram IgG positivo. Em 17 dessas mulheres, 8 tinham anticorpos neutralizantes ao ZIKV, sugerindo resposta específica e não cruzada com dengue.

Recentemente, o Ministério da Saúde confirmou casos de microcefalia por infecção congênita pelo vírus Oropouche (MS, 2024), também detectado em casos revistos na região Norte (Martins et al., 2025), levando à inclusão desses casos neste estudo no RN. Além da microcefalia, crianças expostas ao ZIKV podem apresentar atrasos no desenvolvimento motor, cognitivo, de linguagem, além de autismo, epilepsia e microcefalia tardia (Faïçal et al., 2019; Nielsen-Saines et al., 2019; Mulkey et al., 2020). Por isso, mesmo crianças normocefálicas, mas expostas ao ZIKV no útero, devem ser acompanhadas para detecção precoce de manifestações da SCVZ e adequada intervenção no SUS.

Além do dano viral direto ao SNC, infecções gestacionais podem romper a tolerância imunológica materna ao feto, induzindo a ativação imune materna (AIM), associada a autismo e esquizofrenia em humanos e modelos animais (Han et al., 2021; Knuesel et al., 2014). Assim, mesmo sem infecção fetal direta, a resposta inflamatória materna pode afetar o neurodesenvolvimento da criança. Outro possível mecanismo são os autoanticorpos maternos, como os dirigidos contra receptores de NMDA, associados a alterações neurológicas e psiquiátricas (Dalmau et al., 2019).

Nosso grupo investiga a presença de autoanticorpos contra proteínas do SNC em pares mãe-filho. As amostras foram coletadas com média de 692 ± 87 dias de vida das crianças. Foram realizados ensaios de ELISA para IgGs e IgMs autorreativos. Para distinguir autoimunidade contra o SNC embrionário de autoimunidade materna, foi utilizado como antígeno o fator de transcrição ENGRAILED1, expresso no rombencéfalo embrionário, mas

quase ausente no cérebro adulto. As mães de crianças com SCVZ apresentaram níveis mais elevados de IgG e IgM contra ENGRAILED1, enquanto as crianças mostraram elevação apenas de IgM. Também foi testada a presença de autoanticorpos IgG contra antígenos dos gânglios basais, revelando maiores níveis tanto nas mães quanto nas crianças com SCVZ, sugerindo memória imunológica da infecção viral. Não houve correlação entre os níveis de autoanticorpos contra ENGRAILED1 e gânglios basais, sugerindo respostas imunes distintas.

Esses dados indicam a importância do monitoramento contínuo de gestantes expostas a arbovírus e de seus filhos, mesmo na ausência de malformações visíveis, considerando a possibilidade de efeitos neurológicos tardios ou sutis. O estudo também aponta para a relevância de explorar as consequências imunológicas materno-fetais em infecções virais congênitas, especialmente diante do ressurgimento de arboviroses como ZIKV e Oropouche no Brasil.

Metodologia

Arrolamento de pacientes

O estudo acompanhará pacientes com síndrome congênita do vírus Zika (SCVZ) ou exposição a outras arboviroses no ambulatório multiprofissional pediátrico do HUOL. Novos participantes poderão ter coleta inicial de dados na MEJC. Serão incluídos pacientes com exposição comprovada a arbovírus durante a gestação ou com malformações típicas da SCVZ, como calcificações intracranianas. Os exames seguirão o Protocolo do Ministério da Saúde, com possibilidade de testes complementares, como o ensaio de neutralização do ZIKV em células VERO.

Critérios de inclusão: diagnóstico ou suspeita de SCVZ ou exposição congênita a arboviroses, a partir de 2024, com assinatura do TCLE. Critérios de exclusão: microcefalia com causa definida (TORCHS ou síndromes genéticas). Serão adotados os critérios do MS para definição de microcefalia: para recém-nascidos a termo, perímetro cefálico $\leq 31,5$ cm (meninas) ou $\leq 31,9$ cm (meninos); para pré-termo, os valores seguirão o padrão Intergrowth 21st.

Pacientes normocefálicos com exposição intrauterina a arbovírus também serão incluídos, assim como suas mães. O estudo não envolve riscos, pois utilizará apenas informações obtidas em anamnese, exame físico e exames de rotina (Anexo 3). A amostra será por conveniência, abrangendo pacientes atendidos entre o segundo semestre de 2024 e o primeiro de 2028.

Os atendimentos serão semanais e realizados por equipe composta por pediatra, neurologista, infectologista, fonoaudióloga, fisioterapeuta, nutricionista e assistente social, que já acompanha pacientes da epidemia de 2015-2016. Os dados clínicos serão registrados por bolsistas e discentes em planilha própria e pareados com dados de mães e crianças não infectadas pelo ZIKV.

Caracterização do fenótipo neural por imagem

Pacientes novos com diagnóstico de microcefalia serão encaminhados para exame de tomografia computadorizada realizado pela equipe do HUOL. Aqueles pacientes diagnosticados como normocefálicos serão encaminhados para exame de ecografia transfontanelar, para evitar exposição desnecessária à radiação. Caso haja algum achado de relevância clínica, o paciente pode ser encaminhado para a tomografia computadorizada. Aqueles pacientes identificados durante a gestação também serão examinados por ultrassonografia.

Caracterização do fenótipo neurofisiológico por EEG

Todos os pacientes serão encaminhados para exame de EEG. Esses registros serão então analisados por um neurologista experiente para checar a presença de grafos patológicos. Utilizaremos também as ferramentas automáticas de detecção de espículas interictais e fusos do sono para quantificar a atividade patológica e sua correlação com efeitos sobre a fisiologia do paciente. Pacientes sadios pareados por idade serão recrutados para o grupo controle.

Avaliação neurológica e psiquiátrica das mães dos pacientes

As mães de pacientes SCVZ passarão por exame de imagem ressonância magnética (MRI) do crânio para detectar qualquer alteração inflamatória no encéfalo no Centro de Imagem do Hospital Onofre Lopes-UFRN. As pacientes passarão por uma avaliação psiquiátrica e neurológica e serão classificadas na escala de severidade de depressão Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale (MADRS).

Deteção de autoanticorpos neurais

O sangue das mães de pacientes SCVZ e controles pareados pela idade das crianças será coletado para posterior isolamento do soro. O auto anticorpo melhor descrito em diferentes casos de inflamação do SNC é o que reconhece a subunidade 1 do receptor de NMDA (GluN1; Hara et al., 2018). O padrão ouro para a detecção deste anticorpo em pacientes (e que será utilizado aqui) passa por uma primeira fase de triagem onde o soro dos pacientes são testados contra 1- cortes de cérebro de roedores (camundongo C57-BL6), 2- placa de ELISA sensibilizada com GluN1 recombinante. A reatividade contra estes antígenos terá a correlação testada com os níveis de anticorpos contra o vírus Zika.

Uma das observações morfológicas que fizemos em pacientes microcefálicos foi que apenas aproximadamente 40% deles apresentam malformações mais caudais, como as do cerebelo e tronco encefálico. Assim, nós selecionamos a proteína Engrailed1, uma proteína homeobox expressa em poucos neurônios do tronco encefálico de adultos mas que é altamente expressa no rombencéfalo durante a embriogênese e está envolvida em sua padronização (Wurst et al., 1994). Além disso, células neurais sob estresse podem transferir Engrailed1. Essa transferência promove a sobrevivência de astrócitos e neurônios do mesencéfalo (Vargas Abonce et al., 2019).

Nossos resultados preliminares mostram que mães de pacientes SCVZ com microcefalia possuem mais anticorpos contra Engrailed1 e que a quantidade de anticorpos está

correlacionada positivamente com a quantidade de anticorpos contra o vírus Zika. Além disso, essas mães também apresentam reatividade aumentada em kit diagnóstico para autoanticorpos envolvidos em encefalite autoimune contra os gânglios da base (Creative Biolabs, # NAK-003; laboratórios de Eduardo Sequerra e Selma Jerônimo, dados não publicados).

Resultados e Discussões

Quando nasce uma criança com malformação do sistema nervoso central causada por ZIKV, pouco se faz além de combater os sintomas. No entanto, após anos de pesquisa, entendemos hoje que a malformação pode estar em progressão, gerando tanto microcefalia pós-natal (em pacientes que nasceram normocefálicos; Nielsen-Saines et al., 2019; Siqueira Mello et al., 2019) como microcefalia em que o paciente perde massa encefálica após o nascimento (Jucá et al., 2018; van der Linden et al., 2019). Nos casos de perda de massa encefálica o líquido cefalorraquidiano já não apresenta mais ZIKV (testado por PCR; van der Linden et al., 2019), sugerindo então que a piora dos casos se dá por uma inflamação persistente. Obviamente, estes casos são ilustrações mais óbvias de que há uma inflamação persistente no cérebro de pacientes com SCVZ, mas existe a possibilidade de que outros pacientes apresentem níveis mais brandos de inflamação que atrapalhem o seu desenvolvimento.

Aqui, testamos pela primeira vez uma hipótese para explicar a inflamação persistente do cérebro de pacientes com SCVZ. Durante o primeiro ano de vida, muitos anticorpos maternos permanecem circulando no sangue (Kiliç et al., 2003; Watanaveeradej et al., 2003; Leuridan and Van Damme, 2007; Leuridan et al., 2011). Durante a infecção de camundongos adultos com ZIKV, ou mesmo com a imunização com a proteína NS1 deste vírus, acontece a produção de autoanticorpos contra proteínas presentes no cérebro e músculo esquelético (Cavazzoni et al., 2021). Assim, se mães produzirem autoanticorpos contra alvos neurais durante a infecção por ZIKV, estes podem permanecer afetando o desenvolvimento e a resposta imune cerebral dos seus filhos após o nascimento. Aqui, pretendemos estabelecer experimentos que sirvam de diagnóstico para a presença destes no sangue. Uma vez identificada a presença de autoanticorpos neurais, podemos traçar estratégias de mitigar os seus efeitos.

Outra consequência da presença de autoanticorpos neurais no sangue é a sua contribuição para quadros de depressão (Wang et al., 2022; Shimo et al., 2023). De fato, mães de pacientes com SCVZ apresentam depressão com maior frequência (Kuper et al., 2019). Assim, além das condições sociais difíceis que envolvem o cuidar de uma criança com necessidades especiais, é possível que o passado de imunização destas mães contribua para o seu quadro psiquiátrico. A produção de autoanticorpos é tratável.

Os dados mostram que as mães de pacientes com SCVZ apresentaram níveis mais elevados de IgG e IgM contra a proteína ENGRAILED1 (ENG-1) (Fig. 1 e 2), enquanto as crianças apresentaram apenas níveis elevados de IgM contra ENG-1 (Fig. 1 e 2). Para confirmar a presença de autoanticorpos neurais no sangue dos pares, testamos seus soros com um ensaio comercial de ELISA para detecção de autoanticorpos contra um antígeno dos gânglios basais (normalmente utilizado em pacientes com déficits motores e suspeita de encefalite autoimune). Nossos resultados mostram que tanto as mães quanto os pacientes com SCVZ

apresentam maior expressão de autoanticorpos IgG contra o antígeno dos gânglios basais (Fig. 3)

Curiosamente, não há correlação entre a expressão de IgG ou IgM contra ENG-1 nos pacientes (Fig. 4), sugerindo que a produção de autoanticorpos contra esses dois alvos em cada paciente é independente. Esses dados sugerem que parte dos pares mãe-criança microcefálica manteve uma memória imunológica da infecção viral do SNC fetal na forma de autoantígenos neurais. Além dos testes contra a proteína Engrailed1, foi analisada a presença de anticorpos contra o vírus Zika e outros quatro tipos de arbovírus, com o objetivo de caracterizar a resposta imune frente a essas infecções. O grupo de mães apresentou uma expressão mais elevada de anticorpos contra o ZIKV e os quatro sorotipos do vírus da dengue do que seus filhos com CZVS, sugerindo uma resposta imatura dos fetos ao vírus (Fig. 5). Dados preliminares sugerem o reconhecimento de mais alvos de proteínas do sistema nervoso central por mães de crianças com SCZV. A análise por Western Blot demonstra que as mães SCZV, principalmente aquelas com alta reatividade contra antígenos do SNC, como EN1 e gânglios da base apresentam maior reconhecimento de proteínas cerebrais. Por outro lado, mães SCZV com baixa ou nenhuma reatividade aos antígenos apresentam um perfil próximo às mães controle (Fig. 6). Esse padrão de produção de autoanticorpos com múltiplos alvos neurais pode contribuir para uma inflamação persistente, ou alterações neurológicas. Assim, pretendemos adicionar a avaliação da saúde neurológica/psiquiátrica das mães a este projeto, além de ampliar os ensaios de ELISA contra um painel de antígenos neurais e com a IgA contra Engrailed1, uma vez que esta classe de anticorpos é rica nas meninges (Fitzpatrick et al., 2020).

Essa pesquisa pode trazer esperança e otimismo para essa população. Além disso, outras populações podem ser afetadas em futuros estudos, como todos os pares mãe-paciente com infecção congênita por TORCHs.

Conclusão

Os dados anteriormente citados reforçam a hipótese que a infecção congênita pelo Zika vírus desencadeia uma resposta imune persistente em ambos mães e crianças, podendo desencadear impactos no neurodesenvolvimento infantil, assim como na saúde mental materna. A presença de autoanticorpos neurais nos pacientes afetados pela SCZV apontam para um processo imunológico que vai além da infecção inicial, podendo progredir para quadros neurológicos posteriores.

Nossos achados mostram que mães de crianças com SCVZ apresentam níveis elevados de autoanticorpos IgG e IgM contra a proteína neural ENGRAILED1, enquanto seus filhos apresentam apenas IgM, sugerindo exposição imunológica fetal sem produção de anticorpos de memória. Além disso, foi detectada alta expressão de autoanticorpos IgG contra antígenos dos gânglios basais tanto nas mães quanto nas crianças, reforçando a hipótese de memória imunológica persistente da infecção viral do SNC fetal.

O estudo reforça a necessidade intensiva de acompanhamento de crianças expostas ao Zika vírus, assim como suas mães. Os dados obtidos acerca dos anticorpos sugerem ser uma ferramenta importante para futuros diagnósticos, além de abrirem caminhos para novas estratégias terapêuticas para mitigar os efeitos persistentes nos afetados.

Com isso, se mostra importante ampliação de ensaios sorológicos para outras infecções congênitas, como as do grupo TORCHS, para verificar se fenômenos semelhantes de autoimunidade podem ocorrer.

Referências

Anderson, D., Neri, J. I. C. F., Souza, C. R. M., Valverde, J. G., De Araújo, J. M. G., Nascimento, M. D. S. B., et al. (2021). **Zika Virus Changes Methylation of Genes Involved in Immune Response and Neural Development in Brazilian Babies Born With Congenital Microcephaly**. J. Infect. Dis. 223, 435–440. doi: 10.1093/infdis/jiaa383

Arrais, N. M. R., de Souza, P. V. S., Leite, G. C. P., Bezerra, M. T. A. L., Maia, C. R. S., and de Moraes-Pinto, M. I. (2021). **Congenital heart disease in Zika virus congenital syndrome: How and when to investigate**. Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 110, 3343–3345. doi: 10.1111/apa.16063

Blackmon, K., Waechter, R., Landon, B., Noël, T., Macpherson, C., Donald, T., et al. (2020). **Epilepsy surveillance in normocephalic children with and without prenatal Zika virus exposure**. PLoS Negl. Trop. Dis. 14, e0008874. doi: 10.1371/journal.pntd.0008874

Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., Filippis, I. de, Fabri, A., et al. (2016). **Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study**. Lancet Infect. Dis. 16, 653–660. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00095-5

Dalmau, J., Armangué, T., Planagumà, J., Radošević, M., Mannara, F., Leypoldt, F., et al. (2019). **An update on anti-NMDA receptor encephalitis for neurologists and psychiatrists: mechanisms and models**. Lancet Neurol. 18, 1045–1057. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30244-3

Faiçal, A. V., de Oliveira, J. C., Oliveira, J. V. V., de Almeida, B. L., Agra, I. A., Alcantara, L. C. J., et al. (2019). **Neurodevelopmental delay in normocephalic children with in utero exposure to Zika virus**. BMJ Paediatr. Open 3, e000486. doi: 10.1136/bmjpo-2019-000486

França, G. V. A., Schuler-Faccini, L., Oliveira, W. K., Henriques, C. M. P., Carmo, E. H., Pedi, V. D., et al. (2016). **Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation**. The Lancet 388, 891–897. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30902-3

Garcez, P. P., Loiola, E. C., Costa, R. M. da, Higa, L. M., Trindade, P., Delvecchio, R., et al. (2016). **Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids**. *Science* 352, 816–818. doi: 10.1126/science.aaf6116

Han, V. X., Patel, S., Jones, H. F., and Dale, R. C. (2021). **Maternal immune activation and neuroinflammation in human neurodevelopmental disorders**. *Nat. Rev. Neurol.* 17, 564–579. doi: 10.1038/s41582-021-00530-8

Hara, M., Martinez-Hernandez, E., Ariño, H., Armangué, T., Spatola, M., Petit-Pedrol, M., et al. (2018). **Clinical and pathogenic significance of IgG, IgA, and IgM antibodies against the NMDA receptor**. *Neurology* 90, e1386–e1394. doi: 10.1212/WNL.0000000000005329

Knuesel, I., Chicha, L., Britschgi, M., Schobel, S. A., Bodmer, M., Hellings, J. A., et al. (2014). **Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders**. *Nat. Rev. Neurol.* 10, 643–660. doi: 10.1038/nrneurol.2014.187

Ministério da Saúde, Brasil (2024). **Nota Técnica no 15/2024-SVSA/MS — Ministério da Saúde**. Available at: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/notas-tecnicas/2024/nota-tecnica-no-15-2024-svsa-ms.pdf/view> (Accessed July 24, 2024).

Mulkey, S. B., Arroyave-Wessel, M., Peyton, C., Bulas, D. I., Fourzali, Y., Jiang, J., et al. (2020). **Neurodevelopmental Abnormalities in Children With In Utero Zika Virus Exposure Without Congenital Zika Syndrome**. *JAMA Pediatr.* 174, 269–276. doi: 10.1001/jamapediatrics.2019.5204

Nielsen-Saines, K., Brasil, P., Kerin, T., Vasconcelos, Z., Gabaglia, C. R., Damasceno, L., et al. (2019). **Delayed childhood neurodevelopment and neurosensory alterations in the second year of life in a prospective cohort of ZIKV-exposed children**. *Nat. Med.* 25, 1213–1217. doi: 10.1038/s41591-019-0496-1

Rio Grande do Norte (2020). **Boletim epidemiológico, Monitoramento dos casos de microcefalia e/ou alteração do sistema nervoso central no Rio Grande do Norte. Semana epidemiológica - 07/2020**. Available at: <http://www.adcon.rn.gov.br/ACERVO/sesap/DOC/DOC000000000225581.PDF>

Rio Grande do Norte (2021). **Boletim Epidemiológico: Arboviroses (dengue, chikungunya e zika)**. Available at: <http://www.adcon.rn.gov.br/ACERVO/sesap/DOC/DOC000000000277967.PDF>

Sequerra, E. B., Rocha, Antonio J, Medeiros, Galtieri O C, Neto, Manuel M, Maia, C R S, Arrais, N M R, et al. (2020). **Association between brain morphology and electrophysiological features in Congenital Zika Virus Syndrome: A cross-sectional, observational study.** *EClinicalMedicine*. Available at: [https://www.thelancet.com/journals/eclinm/article/PIIS2589-5370\(20\)30252-2/fulltext?fbclid=IwAR1vzLXpkHp9xbT7TtmOBUKb4AqpoO6nyQ1cijWWXD_vaBjIq6fm3eLPSbM](https://www.thelancet.com/journals/eclinm/article/PIIS2589-5370(20)30252-2/fulltext?fbclid=IwAR1vzLXpkHp9xbT7TtmOBUKb4AqpoO6nyQ1cijWWXD_vaBjIq6fm3eLPSbM) (Accessed November 16, 2020).

Siqueira Mello, A., Pascalicchio Bertozzi, A. P. A., Rodrigues, M. M. D., Gazeta, R. E., Moron, A. F., Soriano-Arandes, A., et al. (2019). **Development of Secondary Microcephaly After Delivery: Possible Consequence of Mother-Baby Transmission of Zika Virus in Breast Milk.** *Am. J. Case Rep.* 20, 723–725. doi: 10.12659/AJCR.915726

Vargas Abonce, S. E., Leboeuf, M., Prochiantz, A., and Moya, K. L. (2019). **Homeoprotein Neuroprotection of Embryonic Neuronal Cells.** *eNeuro* 6, ENEURO.0061-19.2019. doi: 10.1523/ENEURO.0061-19.2019

Wang, H.-Y., Yang, X.-Y., Han, J., Liu, H., Yan, Z.-R., and Liang, Z. (2022). **Clinical characteristics of anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis in patients with a long-term history of mental disorders.** *Eur. J. Med. Res.* 27, 38. doi: 10.1186/s40001-022-00664-5

Wurst, W., Auerbach, A. B., and Joyner, A. L. (1994). **Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum.** *Development* 120, 2065–2075.

Anexos

Figura 1 - Gráfico de dispersão mostrando autoanticorpos IgG contra a proteína neural EN1 em mães e crianças com SCVZ, com densidade óptica (%) em relação às mães controle. À esquerda, imagem do Allen Brain Atlas com a expressão de EN1 no cérebro.

Figura 2 - Gráfico de dispersão representando a detecção de autoanticorpos IgM contra a proteína neural EN1 em mães e crianças com SCVZ, com os níveis de densidade óptica (D.O.) expressos em porcentagem em relação às mães controle.

Figura 3 - Gráfico de dispersão representando a detecção de autoanticorpos IgG contra antígeno dos gânglios basais em mães e crianças com SCVZ, com os níveis de densidade óptica (D.O.) expressos em porcentagem em relação ao controle positivo.

Figura 4 - Densidade Óptica (D.O.) de anticorpos anti-EN1, expressa como porcentagem em relação às mães controle, comparando os níveis de IgM e IgG.

Figura 5 - Gráfico de linha representando a detecção de IgGs anti-arbovírus (ZIKV, DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4) em mães e crianças com SCVZ, com os níveis de densidade óptica expressos em unidades arbitrárias (U.A.).

Figura 6 – Western blot mostrando o reconhecimento de antígenos neurais por autoanticorpos em mães de crianças com SCVZ. As bandas indicam proteínas neurais reconhecidas em diferentes perfis sorológicos.

CÓDIGO: SB1451

AUTOR: PEDRO HENRIQUE SOUSA DE OLIVEIRA XAVIER

COAUTOR: ANA AUGUSTA DE CARVALHO RANGEL

COAUTOR: ANTONIO JHONES LIMA DA ROCHA

ORIENTADOR: CLAUDIO MARCOS TEIXEIRA DE QUEIROZ

TÍTULO: Efeito do ciclo sono-vigília sobre a expressão de oscilações de alta frequência fisiológicas e patológicas

Resumo

As oscilações de alta frequência (80–500 Hz) incluem eventos fisiológicos, como os ripples (80–200 Hz), e patológicos, acima de 200 Hz. Os ripples estão associados à consolidação da memória e predominam no sono de ondas lentas, enquanto oscilações patológicas refletem estados de hiperexcitabilidade e atividade epileptogênica. Estudos prévios do nosso grupo mostraram que, após o estado epiléptico (SE) induzido por pilocarpina intra-hipocampal, os ripples desaparecem e são substituídos por oscilações patológicas. Uma semana após o SE, observamos o retorno dos ripples, principalmente no sono de ondas lentas, além da presença de espículas interictais, tanto nesse estado quanto, de forma esporádica, no sono REM. Neste trabalho, buscamos caracterizar a dinâmica dessas oscilações ao longo do ciclo sono-vigília em animais naïve e cronicamente epilépticos. Para isso, serão construídos hipnogramas, analisadas métricas de eficiência e arquitetura do sono, e desenvolvidos algoritmos para a detecção de ripples e espículas interictais. Esperamos identificar diferenças entre oscilações fisiológicas e patológicas, correlacionando-as com estados específicos do sono. Os resultados poderão esclarecer mecanismos de interação entre epilepsia e sono, contribuindo para a compreensão de processos de memória e atividade epileptogênica

Palavras-chave: Sono. Epilepsia. Oscilações de alta frequência. Hipocampo.

TITLE: Effect of the sleep-wake cycle on the expression of physiological and pathological high-frequency oscillations

Abstract

High-frequency oscillations (80–500 Hz) include physiological events, such as ripples (80–200 Hz), and pathological ones, above 200 Hz. Ripples are associated with memory consolidation and are predominant during slow-wave sleep, whereas pathological oscillations reflect hyperexcitability and epileptogenic activity. Previous studies from our group demonstrated that, after status epilepticus (SE) induced by intra-hippocampal pilocarpine, ripples disappear and are replaced by pathological oscillations. One week after SE, ripples reappear, especially during slow-wave sleep, alongside interictal spikes, which are mostly present in this state but occasionally detected during REM sleep. This study aims to characterize the dynamics of these oscillations throughout the sleep-wake cycle in naïve and chronically epileptic animals. To achieve this, we will construct hypnograms, analyze sleep efficiency and architecture metrics, and develop algorithms for ripple and interictal spike

detection. We expect to identify differences between physiological and pathological oscillations, correlating them with specific sleep states. Our findings may provide insights into the interplay between epilepsy and sleep, contributing to the understanding of memory processes and epileptogenic activity.

Keywords: Sleep. Epilepsy. High-frequency oscillations. Hippocampus.

Introdução

As oscilações de alta frequência (HFOs; 80-500 Hz) são eventos neurais importantes tanto em processos fisiológicos quanto patológicos. As HFOs fisiológicas, ou ripples (80-200 Hz), ocorrem predominantemente durante o sono de ondas lentas (SWS) e são consideradas biomarcadores da consolidação da memória (Buzsáki, 2015). Em contraste, HFOs patológicas (>200 Hz) são marcadores de hiperexcitabilidade neuronal, encontradas em áreas do cérebro que originam crises epiléticas.

Nosso grupo de pesquisa utiliza um modelo de epilepsia induzido por pilocarpina intra-hipocampal, que provoca um estado epilético (SE) grave (Moura et al., 2020, 2021). Estudos prévios demonstraram que, após o SE, os ripples desaparecem e são substituídos por HFOs patológicas (Rocha, 2021). Análises preliminares indicam que os ripples retornam após uma semana, coexistindo com espículas interictais, principalmente durante o SWS, mas também de forma esporádica no sono REM.

A coexistência de HFOs fisiológicas e patológicas, juntamente com as alterações na arquitetura do sono induzidas pela epilepsia, torna essencial uma caracterização precisa de como o ciclo sono-vigília modula esses eventos. Assim, este projeto busca diferenciar as HFOs em animais saudáveis e epiléticos, correlacionando sua ocorrência com estágios específicos do sono para avançar no entendimento da interação entre epilepsia, memória e atividade neural.

Metodologia

Os dados analisados são de um banco de dados de 7 animais (expansão de N=6), gerado no projeto de mestrado de Rocha (2021). Todos os procedimentos experimentais seguiram o protocolo de Rocha (2021), aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRN (protocolo n.º 070/2015).

Animais e Condições de Alojamento Foram utilizados camundongos machos C57BL/6J (10-14 semanas, 25-30 g), mantidos em condições controladas de temperatura (21-24°C), umidade (50-70%) e ciclo claro/escuro de 12h, com água e comida ad libitum.

Procedimento Cirúrgico e Implante de Eletrodos Anestesiados com isoflurano, os animais foram posicionados em um aparelho estereotáxico para o implante de uma cânula-guia sobre o giro denteado direito (Coordenadas: AP: -2.8, ML: 2.5, DV: -2.5 mm, a partir do bregma). Foram implantados bilateralmente arranjos de eletrodos de tungstênio no hipocampo dorsal e córtex retroesplênico, além de parafusos para ECoG e fios na musculatura da nuca para EMG. Um eletrodo de referência/terra foi posicionado sobre o cerebelo (Figura 1). Após a cirurgia e tratamento (anti-inflamatório, antimicrobiano e analgésico), os animais recuperaram-se por no mínimo uma semana.

Indução do Status Epilepticus (SE) O SE foi induzido com uma única injeção intra-hipocampal de pilocarpina (560 µg em 800 nL) via cânula implantada. O SE foi definido como uma crise >5 minutos com correlatos eletrofisiológicos e comportamentais. Duas horas após a indução, administrou-se diazepam (10 mg/kg, i.p.) para interromper o SE.

Registro Eletrofisiológico Após recuperação e habituação, iniciaram-se os registros. Os sinais (LFP, ECoG, EMG) foram amplificados, filtrados (1 Hz - 1 kHz) e digitalizados a 25 kHz (sistema Intan Technologies). O protocolo incluiu duas sessões de linha de base (5-6h cada) pré-SE. O SE foi registrado continuamente, e os registros pós-SE ocorreram nos dias +1, +2, +7 e +30.

Análise do Ciclo Sono-Vigília e Ferramenta de Visualização Os hipnogramas de referência foram construídos manualmente (Rocha, 2021). Para otimizar a análise, desenvolveu-se o NeuroScope, uma ferramenta em Python (atualmente em desenvolvimento) para auxiliar a classificação manual (Figura 2). O NeuroScope não classifica automaticamente, mas exibe sincronicamente múltiplos parâmetros (EMG, potências de banda delta e teta, razão teta/delta, indicador de spindles, etc.), tornando a classificação humana mais rápida e precisa.

Análise Estatística Algoritmos em Python foram desenvolvidos para a análise dos dados. As diferenças na potência absoluta média do sinal entre as condições (BL, SE+1, +2, +7, +30) foram investigadas com ANOVA de medidas repetidas (rmANOVA) e correção post-hoc de Bonferroni ($\alpha=0.05$). Esta análise foi realizada em 4 dos 7 animais, pois os demais não possuíam registros completos em todas as condições, um pré-requisito do teste.

Deteção de Oscilações de Alta Frequência (HFOs) A deteção de HFOs seguiu o protocolo de Rocha (2021) com a biblioteca RIPPLELAB (Navarrete et al., 2016). O método usou o algoritmo Short-Term Energy (STE) no sinal de LFP filtrado (80-200 Hz para ripples; 200-450 Hz para HFOs patológicas). Eventos com no mínimo 7 picos consecutivos com energia >2 desvios-padrão da média foram considerados e, em seguida, passaram por rigorosa inspeção visual para remoção de artefatos.

Resultados e Discussões

A interface do NeuroScope permite ao classificador confirmar visualmente suas decisões com base em múltiplos fluxos de dados. Como observado na Figura 3, o sono de ondas lentas (SWS) é inequivocamente identificado pela alta potência na banda delta, enquanto o sono REM se destaca pela combinação de alta potência teta, atonia muscular (EMG mínimo) e, consequentemente, uma elevada razão teta/delta.

Ao consolidar essas informações, a ferramenta agiliza a análise e aumenta a consistência da classificação manual. Embora o software ainda esteja em desenvolvimento, esta versão funcional já valida sua utilidade como um auxílio robusto para a análise neurofisiológica, estabelecendo a base para a quantificação das alterações na arquitetura do sono em animais epilépticos.

A arquitetura do ciclo sono-vigília foi quantificada em todas as condições experimentais. A análise revelou uma alteração aguda e robusta no primeiro dia após o status epilepticus (SE+1), como ilustrado na Figura 4. Nesta condição, observou-se um aumento no tempo em sono de ondas lentas (SWS), que ocupou em média 49.9% ($\pm 3.5\%$ EPM) do tempo de registro, em comparação com 38.8% ($\pm 3.1\%$ EPM) no período basal (BL).

Concomitantemente, houve uma redução no tempo em vigília ativa (aWK), que caiu de 38.7% ($\pm 3.5\%$ EPM) para 22.6% ($\pm 3.3\%$ EPM). Este aumento no sono de ondas lentas pode representar uma resposta homeostática compensatória do cérebro ao insulto neuronal severo provocado pelo SE. Nos dias subsequentes (SE+2, SE+7 e SE+30), a arquitetura do sono tendeu a retornar a um padrão mais próximo ao basal, embora com alta variabilidade entre os indivíduos.

Análise Quantitativa e Qualitativa do Sono de Ondas Lentas (SWS)

Dado o papel central do SWS na consolidação da memória e na geração de ripples, foi realizada uma análise aprofundada deste estágio do sono. A partir de todo o banco de dados, foram identificados e isolados um total de 3.260 episódios de SWS. Devido à alta variabilidade na duração desses episódios, foi feita uma classificação baseada em sua distribuição de densidade, permitindo a categorização em episódios "curtos" (entre 50 e 200 segundos) e "longos" (> 200 segundos) para análises futuras mais detalhadas.

A investigação da qualidade do SWS, por meio de análises como a Densidade Espectral de Potência (PSD), sugeriu uma tendência de redução na potência da banda delta nos estágios crônicos da epileptogênese (dados não mostrados). Para avaliar estatisticamente se havia uma mudança geral na potência do sinal entre as condições, foi calculada a potência absoluta média para cada sessão e comparada através de uma ANOVA de medidas repetidas (rmANOVA) em um subgrupo de 4 animais.

Visualmente, o gráfico da potência absoluta média, como ilustra a Figura 5, sugere uma flutuação ao longo dos dias, com os níveis mais baixos ocorrendo nas condições SE+7 e SE+30. No entanto, o teste estatístico não confirmou essa tendência de forma significativa ($F(4,12) = 1.68$, $p = 0.22$). A comparação par-a-par que mais se aproximou da significância foi entre a linha de base (BL) e a condição SE+30 (p não corrigido = 0.067), mas não atingiu o limiar de $\alpha = 0.05$ após as correções para comparações múltiplas. A ausência de significância estatística pode ser atribuída à alta variabilidade interanimal e ao tamanho amostral reduzido ($N=4$) para este teste específico.

Análise da Taxa de Ripples Durante a Epileptogênese

Além das alterações na arquitetura e qualidade do sono, foi investigado o impacto da epileptogênese sobre os ripples hipocampais, oscilações fundamentais para a consolidação da memória. A análise dos dados revelou uma supressão abrupta e duradoura desses eventos após o insulto epileptogênico, conforme detalhado na Figura 6.

O número total de ripples detectados foi maior no período basal, com uma queda acentuada já no primeiro dia após o SE (SE+1), que apresentou o menor número de eventos registrados. Essa redução foi confirmada pela análise da taxa de ocorrência (eventos/min), que diminuiu de uma média de 12.8 eventos/min no período basal para 2.6 eventos/min em SE+1. De acordo com Rocha (2021), essa diminuição na taxa de ripples foi estatisticamente significativa ($p=0,01$, ANOVA) e não retornou aos níveis basais mesmo 30 dias após o SE. Este resultado sugere que o SE provoca uma disfunção imediata e persistente na rede hipocampal responsável pela geração de ripples, com potenciais consequências para os processos cognitivos dependentes dessas oscilações.

Conclusão

O presente trabalho cumpriu seus objetivos ao avançar na caracterização das alterações do ciclo sono-vigília induzidas pela epileptogênese. O desenvolvimento da ferramenta computacional NeuroScope foi um avanço metodológico, permitindo uma análise visual integrada e detalhada dos registros eletrofisiológicos, que se mostrou útil para a validação dos estágios do sono.

As análises revelaram que o status epilepticus promove uma alteração bifásica no sono: uma mudança aguda e robusta na arquitetura, marcada pelo aumento da quantidade de SWS no período imediatamente após o insulto, seguida por um prejuízo crônico na qualidade deste estágio, evidenciado pela redução progressiva da potência na banda delta.

A diminuição da potência das ondas lentas na fase crônica sugere que, para além da ocorrência de eventos epileptiformes, a própria homeostase e a função restauradora do sono podem estar comprometidas a longo prazo, com potenciais implicações para os processos de consolidação de memória associados ao SWS. Este estudo estabelece uma base sólida para a próxima etapa do projeto, que consistirá em utilizar a classificação precisa dos estágios do sono para investigar como a expressão de oscilações de alta frequência, tanto fisiológicas (ripples) quanto patológicas, é modulada pelas alterações crônicas na arquitetura e qualidade do sono.

Referências

- Buzsáki, G. (2015). Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus*, 25(10), 1073–1088.
- Moura, D. M. S., Brandão, J. A., Lentini, C., Heinrich, C., Queiroz, C. M., & Costa, M. R. (2020). Evidence of Progenitor Cell Lineage Rerouting in the Adult Mouse Hippocampus After Status Epilepticus. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 571315.
- Moura, D. M. S., de Sales, I. R. P., Brandão, J. A., Costa, M. R., & Queiroz, C. M. (2021). Disentangling chemical and electrical effects of status epilepticus-induced dentate gyrus abnormalities. *Epilepsy & Behavior*, 121(Pt B), 106575.
- ROCHA, A. J. L. da. Ripples e fast ripples na epileptogênese: caracterização das oscilações de alta frequência após o estado epiléptico. 2021. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Instituto do Cérebro, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021

Anexos

Figura 2: Interface do software NeuroScope

Figura 1: Esquema da preparação cirúrgica para registro eletrofisiológico

Figura 3: Caracterização dos estados do ciclo sono-vigília

Figura 4: Arquitetura do sono ao longo das condições experimentais.

Figura 5: Média da Potência Absoluta do Sinal por Condição Experimental.

Figura 6: Redução no número e na taxa de ocorrência de ripples após o Status Epilepticus (SE)

CÓDIGO: SB1599

AUTOR: JÚLIO CESAR NEVES DO NASCIMENTO

ORIENTADOR: KERSTIN ERIKA SCHMIDT

TÍTULO: Um biomarcador comportamental da integridade de conexões horizontais seletivas no sistema visual em humanos

Resumo

Diversas condições neurológicas apresentam manifestações sutis no sistema visual, que podem ser avaliadas por testes psicofísicos simples. Neste estudo, desenvolvemos uma modificação do estímulo Motion Quartet para investigar a integridade das conexões calosas e intra-hemisféricas no córtex visual primário. Diferentemente do estímulo clássico, variamos a proporção entre as distâncias horizontais e verticais dos elementos e introduzimos Gabors para modular a velocidade do movimento aparente. Os participantes indicaram a direção percebida do movimento por meio do teclado, enquanto parâmetros de posição e tempo foram registrados. Observou-se, nas primeiras aplicações em adultos saudáveis, a ocorrência de transições entre percepções de movimento horizontal e vertical, além da ausência de relatos de fadiga excessiva após dez repetições por ensaio. Esses achados iniciais indicam que o paradigma pode ser explorado em estudos futuros como potencial candidato a biomarcador comportamental da conectividade calosa.

Palavras-chave: Movimento aparente. Estímulo Visual. Motion Quartet.

TITLE: A behavioral biomarker of the integrity of selective horizontal connections in the human visual system

Abstract

Several neurological conditions present subtle manifestations in the visual system, which can be assessed through simple psychophysical tests. In this study, we developed a modification of the Motion Quartet stimulus to investigate the integrity of callosal and intra-hemispheric connections in the primary visual cortex. Unlike the classical stimulus, we varied the ratio between the horizontal and vertical distances of the elements and introduced Gabors to modulate the speed of apparent motion. Participants indicated the perceived direction of motion via keyboard, while position and timing parameters were recorded. In the first applications with healthy adults, we observed transitions between perceptions of horizontal and vertical motion, as well as no reports of excessive fatigue after ten repetitions per trial. These initial observations indicate that the paradigm may be further explored in future studies as a potential behavioral biomarker of callosal connectivity.

Keywords: Apparent Motion. Visual Stimulus. Motion Quartet.

Introdução

Diversas doenças cognitivas e neurológicas apresentam manifestações sutis no sistema visual. Parâmetros da visão podem ser facilmente monitorados por meio de simples testes de psicofísica visual, tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes. Dessa forma, torna-se pertinente buscar marcadores comportamentais que indiquem a seletividade das conexões corticais visuais, refletindo a integridade de tratos de fibras volumosas frequentemente afetados por patologias degenerativas, como o corpo caloso.

É sabido que, no nível do córtex visual primário, o corpo caloso desempenha funções integrativas ao redor da linha média vertical do campo visual (Schmidt, 2016; Innocenti et al., 2022). Uma ferramenta utilizada para analisar as conexões visuais entre os hemisférios é o Motion Quartet (MQT) que consiste em um estímulo biestável que apresenta rápida e alternadamente uma imagem em duas posições distintas gerando uma ilusão de que essa imagem está se movendo entre essas duas posições ou na direção vertical ou horizontal. Essa ilusão é chamada de percepção de movimento aparente. Nesse contexto, o estímulo clássico exibindo movimento aparente entre os dois hemisférios visuais é o Motion Quartet (MQT). Foi sugerido que pode ser utilizado para analisar a integridade das fibras do corpo caloso por trabalhar as relações inter-hemisféricas quando esse movimento é percebido verticalmente e intra hemisféricas quando esse movimento é percebido horizontalmente (Genç et al., 2011).

Metodologia

O estímulo consiste em uma modificação do clássico Motion Quartet (MQT), em que são apresentadas 2 imagens, cada uma contendo 2 elementos de mesma orientação em posições simetricamente opostas. Quando essas imagens alternam entre si, podem gerar a percepção de movimento aparente horizontal ou vertical. A alteração feita para esse experimento foi usar diferentes elementos que compõem visualmente o estímulo, sendo eles 2 elementos chamados de Gabores, formados a partir de uma senoidal modulada com uma gaussiana, orientados vertical e horizontalmente, e um elemento circular isoluminante, sem orientação, que serve como controle. Além disso, esse experimento faz com que os elementos alterem suas posições em 4 padrões de movimentação. Diferente do clássico, que mantinha uma distância de 1 grau visual entre os elementos, os padrões aqui variam essa distância: um deles inicia o estímulo com a distância vertical sendo o dobro da distância padrão de 4,4 graus visuais, e os elementos se aproximam do centro até a metade da distância padrão, enquanto a distância horizontal se mantém fixa; outro inicia com a distância vertical em metade da distância padrão e os elementos se afastam até atingir o dobro dessa distância, também com a distância horizontal fixa; os outros dois seguem a mesma lógica, mas alterando as distâncias horizontais e mantendo a vertical fixa em 4,4 graus visuais. Essas imagens se alternam a cada 0,25 segundos e, a cada troca, a posição de cada elemento é atualizada, com cada movimentação sendo feita em incrementos de 0,1 grau visual. Cada uma dessas 4 movimentações está definida em planilhas contendo cada posição dos elementos, e, assim como a escolha de qual elemento será apresentado, são selecionadas aleatoriamente pelos loops do experimento até que todos os elementos tenham sido apresentados em todas as movimentações, o número de vezes definido por quem conduz o experimento no início de sua realização.

O experimento em si começa com o indivíduo voluntário posicionado com a cabeça fixada a 57 cm de distância do monitor, isso deve ser seguido para garantir que 1 cm na tela do monitor corresponda a 1 grau do campo visual dele. A primeira tela é a tela de introdução,

que explica que o participante está participando de um experimento e que deve indicar, pelas setas no teclado, “seta para cima” quando perceber o estímulo com movimentação vertical e “seta para a direita” caso haja uma mudança de direção na percepção do movimento para horizontal ou o contrário. Além disso, essa tela também solicita que o participante digite quantas repetições para cada uma das 12 derivações serão feitas naquela execução. Após essa entrada, o número digitado serve como parâmetro para o primeiro loop do experimento, que determina quantas vezes ele será executado. Esse primeiro loop sorteia, sem reposição e de forma aleatória, um dos nomes dos arquivos de planilhas contendo os parâmetros do experimento, decidindo assim aleatoriamente a ordem dos trials. O loop interno, que representa o estímulo em si, recebe como entrada a planilha com os parâmetros de posição e de qual imagem será usada. Quando os 12 trials tiverem sido executados a quantidade de vezes determinada pela entrada inicial, o estímulo se encerra, gerando um arquivo CSV com todas as informações referentes às variáveis de posição, tempo e entradas do teclado em cada uma das rotinas executadas.

Resultados e Discussões

Como resultado preliminar deste estudo, depois de uma fase de adequação à plataforma do PsychoPy e de diversas alterações nos parâmetros e na forma como essa ferramenta é usada, o estímulo foi desenvolvido por completo. Para testar se estava sendo executado da forma como deveria, além de definir a métrica de quantas vezes precisaremos repetir todo o experimento em uma mesma seção, foi feita uma coleta preliminar em 3 indivíduos saudáveis dos membros do laboratório, sendo elas com 10 repetições do experimento em uma única seção contínua. Essa coleta teve como principal objetivo definir um número de repetições que tornasse o experimento estatisticamente relevante, além de não ser excessivamente fatigante para os voluntários que participassem, além de validar se os voluntários estavam de fato, vendo a ilusão visual do movimento aparente de forma adequada.

Após essas coletas foi observado que com 10 repetições, resultando em aproximadamente 40 minutos de seção, gerando 3 arquivos csv com mais de 3 mil colunas, contendo informações da posição de cada um dos elementos do estímulo a cada atualização de quadro, além da tecla que foi pressionada pelo voluntário com o seu devido tempo. O resultado foi uma visualização adequada do estímulo, tendo a passagem esperada do movimento em uma direção para outra quase todas as vezes. Quanto ao estado dos voluntários durante o procedimento, foi constatado que, embora os voluntários tenham relatado se sentir entediados, não tiveram maiores reclamações quanto a fadiga visual.

Com esses dados coletados, podemos usar essas informações de distância entre os elementos para calcular a proporção das distâncias horizontal e vertical dos elementos, e assim testar estatisticamente essa métrica para diferentes elementos gráficos, como os Gabores, e futuramente para pessoas com diferentes idades, além de refazer a coleta com as mesmas pessoas algum tempo depois, para analisar a estabilidade desse parâmetro para um mesmo indivíduo.

Conclusão

Dessa forma, buscando marcadores comportamentais aplicáveis tanto a humanos saudáveis idosos quanto a pacientes com doenças neuropsiquiátricas, é de objetivo desse trabalho, desenvolver um estímulo derivado do MQT, com modificações que testam a seletividade dos circuitos em relação à orientação e posição dos elementos a serem agrupados perceptualmente e analisar os dados para validar sua estabilidade para ser tratado como um marcador confiável da integridade das conexões calosas. Para isso, os elementos foram deslocados de forma a se afastar ou se aproximar do centro, permitindo avaliar a influência da variação espacial. Além disso, para analisar o efeito do aumento da velocidade angular em elementos colineares com o eixo de movimento aparente, os pontos do MQT clássico foram substituídos por Gabores de orientação diferente (Seriés et al., 2002; Georges et al., 2002).

Referências

GENÇ, Erhan et al. Interhemispheric connections shape subjective experience of bistable motion. *Current Biology*, v. 21, n. 17, p. 1494-1499, 2011.

GEORGES, Sébastien et al. Orientation dependent modulation of apparent speed: psychophysical evidence. *Vision research*, v. 42, n. 25, p. 2757-2772, 2002.

INNOCENTI, Giorgio M. et al. The functional characterization of callosal connections. *Progress in neurobiology*, v. 208, p. 102186, 2022.

SCHMIDT, K. E. Do lateral intrinsic and callosal axons have comparable actions in early visual areas? In: *Axons and brain architecture*. [S.l.]: Elsevier, 2016. p. 159–182.

CÓDIGO: SB1697

AUTOR: ANDERSON NASCIMENTO SILVA

ORIENTADOR: ADRIANO BRETANHA LOPES TORT

TÍTULO: Separando freezing de imobilidade quieta em roedores: critérios multissinais e validação em protocolo de medo condicionado

Resumo

O comportamento freezing é métrica padrão na quantificação do medo condicionado; porém, definições simplórias baseadas apenas no deslocamento corporal tendem a confundir imobilidade quieta com freezing. Este trabalho constitui um passo inicial para a criação de um pipeline semiautomatizado e reproduzível capaz de distinguir esses comportamentos. Para isso, analisamos vídeos top-down de ratos em um protocolo com fases de condicionamento, extinção e recuperação da memória aversiva. Com rastreamento de um modelo de aprendizado profundo (DeepLabCut), realizamos primeiro uma análise baseada unicamente na ausência de movimento por ≥ 2 s e, em seguida, uma análise manual em duplo-cego. A comparação entre ambas mostrou que, em um animal representativo, o limiar simples superestimou o freezing em $\approx +33,1$ pontos percentuais por sessão. Esses resultados indicam que uma abordagem multifatorial é muito mais precisa. Na continuidade do estudo, pretendemos treinar um classificador no SimBA com o conjunto de rótulos humanos e comparar o desempenho da rede às avaliações manuais, visando automatizar a análise, além de poder identificar diferentes padrões comportamentais entre esses dois estados. Os resultados desse trabalho auxiliaram na realização de uma análise mais fidedigna do comportamento de freezing durante protocolos de medo.

Palavras-chave: comportamento. medo condicionado. freezing. estimação de pose.

TITLE: Separating freezing from quiet immobility in rodents: multi-cue criteria and validation in a fear-conditioning protocol

Abstract

Freezing is a standard metric in fear-conditioning studies, yet simple displacement thresholds often conflate quiet immobility with freezing. We present initial steps toward a semiautomated, reproducible pipeline to distinguish these states. Top-down videos of rats were analyzed across conditioning, extinction, and aversive memory recall. Markerless pose estimation (DeepLabCut) was used to extract head and body kinematics. We first applied a simple immobility rule (no displacement for ≥ 2 s) and then performed double-blind human annotations that considered multiple cues (e.g., posture rigidity, abrupt start/stop transitions, head-angle stability, vibrissal movement). In one representative rat, the simple threshold overestimated freezing by ≈ 33.1 percentage points per session. These results indicate that a multifactor approach is more accurate. As a next step, we will train a supervised classifier with SimBA using the human-curated labels to automate scoring while preserving accuracy and uncover feature patterns that distinguish freezing from quiet immobility. Together, these

findings support more faithful quantification of defensive behavior in fear-conditioning protocols.

Keywords: behavior. freezing. fear conditioning. pose estimation

Introdução

Emoções como medo e ansiedade são componentes adaptativos do comportamento; quando desreguladas, relacionam-se a quadros de transtorno de estresse pós-traumático, fobias e transtornos de ansiedade [Shin & Liberzon, 2010; Ressler et al., 2022]. Esses transtornos acarretam prejuízos relevantes à vida dos indivíduos, de modo que compreender os mecanismos subjacentes à formação da memória aversiva e à expressão do medo é crucial [Milad & Quirk, 2012; VanElzakker et al., 2014]. Uma das formas de estudar esses mecanismos é por meio de modelos animais como os roedores, os quais permitem o controle experimental e medidas objetivas [Quirk & Mueller, 2007; Tovote et al., 2015; Quirk & Beer, 2006].

Em roedores, o medo pode ser investigado de forma inata durante comportamentos de defesa em resposta a predadores ou odores [Tovote et al., 2015; Mikulovic et al., 2018; Perusini & Fanselow, 2015]; ou por medo condicionado, quando um estímulo inicialmente neutro (CS) adquire valor aversivo após pareamento com um estímulo incondicionado (US), por exemplo, um choque nas patas [Kim & Jung, 2006; Phillips & LeDoux, 1992]. Durante o medo condicionado, destaca-se a expressão do comportamento de freezing, caracterizado por imobilidade sustentada com postura rígida — amplamente utilizado pela robustez e expressão nos protocolos de medo [Quirk & Mueller, 2007; Milad & Quirk, 2012; Borkar & Fadok, 2021]. No entanto, roedores não expressam apenas freezing para demonstrar medo: flight, fight e darting também ocorrem na presença de ameaça [Fanselow & Lester, 1988; Tovote et al., 2015; Borkar & Fadok, 2021]. O comportamento adotado irá depender da proximidade/iminência da ameaça [Fanselow & Lester, 1988; Perusini & Fanselow, 2015]. No entanto, apesar de ser amplamente usado para quantificar níveis de medo em roedores, a forma com

o o freezing é caracterizado ainda possui limitações; métodos baseados apenas em limiares de movimento podem ser sensíveis a ruído e confundir imobilidade quieta (ou sono) com freezing [Anagnostaras et al., 2010 ; Pompili et al., 2022].

Abordagens tradicionais baseadas em limiares de deslocamento do corpo tendem a confundir imobilidade quieta (repouso relaxado) com freezing (estado defensivo) [Perusini & Fanselow, 2015], especialmente quando há micromovimentos de cabeça (como focinho e vibrissas) ou ajustes posturais que não são captados por métricas grosseiras (como rigidez corporal) [Anagnostaras et al., 2010; Pompili & Todorova, 2022; Wiltchko et al., 2015]. Essa dificuldade de diferenciação compromete análises realistas do comportamento durante episódios de freezing, prejudicando a reprodutibilidade e dificultando a comparação entre laboratórios [Milad & Quirk, 2012; VanElzakker et al., 2014]. Sendo assim, faz-se necessário empregar análises mais robustas, com o objetivo de distinguir os dois comportamentos (imobilidade quieta vs. freezing), aumentando a fidelidade e a compreensão do comportamento de medo [Tovote et al., 2015; Borkar & Fadok, 2021]. Neste trabalho, apresentamos uma abordagem semiautomatizada para classificação de freezing durante medo condicionado, combinando o DeepLabCut (rastreamento de pontos corporais por estimação de pose) e o SimBA (extração de atributos e classificação supervisionada de comportamentos) [Mathis et al., 2018; Nilsson et al., 2020]. Nossa proposta, portanto, é

diferenciar freezing e imobilidade quieta integrando análises de (i) velocidade corporal, (ii) velocidade angular da cabeça e (iii) estabilidade postural (variação de distâncias/ângulos entre pontos rastreados) (Fig. 2). Com isso, esperamos identificar padrões que distingam freezing de imobilidade quieta, aprimorando a quantificação desse comportamento em protocolos de medo e contribuindo para uma compreensão mais precisa dos mecanismos que regem a sua expressão [Quirk & Mueller, 2007].

Metodologia

Sujeitos experimentais

Os procedimentos seguiram a legislação brasileira (Lei nº 11.794/2008) referente à utilização de animais em pesquisa; as normas foram aprovadas pelo CEUA/UFRN (protocolo 388.016/2024). Foram utilizados 6 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar na idade adulta (3 a 6 meses), pesando entre 250 e 350 gramas em ciclo claro/escuro de 12 horas, em gaiolas de polipropileno ($41 \times 43 \times 16$ cm), temperatura ambiente de ~ 24 °C, com água e ração ad libitum.

Protocolo comportamental.

Os testes foram realizados em uma caixa de esquiwa ($30,7 \times 33,3 \times 54$ cm) com dois contextos que diferem pela cor das paredes e pelo piso — Contexto A: paredes pretas, piso metálico/eletrocondutor; Contexto B: paredes brancas, piso de E.V.A. (Fig. 3). Os estímulos condicionais (CS) foram auditivos e apresentados por 30 s a ~ 75 dB (níveis confirmados por decibelímetro): CS⁻ (ruído branco, neutro) e CS⁺ (tom puro de 7,5 kHz, aversivo). O estímulo incondicionado (US) consistiu em choque nas patas (0,6 mA, 1 s) aplicado pelo piso metálico imediatamente após o término do CS⁺ (apenas na fase de condicionamento). Entre as sessões, as superfícies foram higienizadas alternando-se álcool 70% e ácido acético. Abaixo estão descritas as sessões de comportamento por dia:

Dia 1 — Habitação (HAB; Contexto A).

Exploração livre na caixa por 10 min (sem estímulos).

Dia 2 — Condicionamento (COND; Contexto A).

(i) Habitação aos sons: Apresentação de 4 CS⁻ e 4 CS⁺.

(ii) Condicionamento 8 CS⁻ e 8 CS⁺/US,

Dia 3 — Extinção inicial (EE; Contexto B) e dia 4 — Extinção tardia (LE; Contexto B) apresentação de 12 CS⁺ e 4 CS⁻

Dia 5 — Recuperação da memória de extinção (EMR; Contexto B) e recuperação da memória aversiva (AMR; Contexto A).

Sessão 1 (Contexto B): 2 CS⁺ e 2 CS⁻. Após 2 h no home cage, Sessão 2 (Contexto A): 2 CS⁺ e 2 CS⁻.

Aquisição de vídeo e sincronização.

O comportamento foi registrado por câmera (Logitech C920, top-down, perpendicular ao solo; 1080p, 30 fps), posicionada a 79 cm do plano da arena.

A temporização dos estímulos foi controlada por Arduino UNO (ATmega328) acionado por script em Python. O Arduino enviou pulsos TTL para a Open Ephys, que operou como Master Clock, registrando timestamps dos eventos. Foram marcados onset e offset de cada estímulo: CS-, CS+ e US, além de um LED que marcou o início e o fim das gravações.

Rastreamento (DeepLabCut).

Foram rastreados focinho, orelhas e lombo. O conjunto de treino incluiu quadros de múltiplos animais e de ambos os contextos (A e B). Utilizamos o DeepLabCut, ferramenta construída em torno de um modelo de aprendizado profundo que permite fazer o rastreamento de pontos comportamentais definidos pelo experimentador, onde foram extraídos 20 quadros por vídeo. Após o primeiro treino, realizamos refinamento iterativo: os frames com pior desempenho foram selecionados e reanotados.

Pré-processamento.

Aplicamos uma triagem frame a frame baseada em dois limiares de confiança do DLC para cada ponto (focinho, orelha esquerda, orelha direita): (i) aceitação direta — o frame é aceito quando todos os pontos têm $\text{likelihood} \geq 0,90$; (ii) rejeição — o frame é descartado (marcado como NaN) quando qualquer ponto tem $\text{likelihood} \leq 0,60$; (iii) faixa intermediária — quando os valores ficam entre 0,60 e 0,90, o frame entra em um bloco elegível à interpolação. Nessa condição, realizamos interpolação linear bidirecional de x e y apenas se o bloco de baixa confiança formar lacunas contíguas de até 15 frames; lacunas maiores não são interpoladas e permanecem como NaN, evitando “inventar trajetória” durante oclusões prolongadas. Não aplicamos suavização nesta etapa; o alisamento leve é feito apenas na etapa de cálculo das métricas.

Métricas cinemáticas.

Para a velocidade corporal, definimos um centróide da cabeça por frame como a média das posições de focinho, orelha esquerda e orelha direita; esse centróide foi suavizado com média móvel centrada de 3 frames e a velocidade foi calculada como a norma euclidiana da diferença do centróide entre frames, multiplicada pelo fps da sessão, resultando em px/s. Para a cinemática da cabeça, o ângulo primário foi obtido do vetor (focinho – centro das orelhas) via $\arctan2$ (graus); como backup em frames com focinho incerto, utilizamos o eixo orelha–orelha. A variação angular por frame foi a diferença absoluta entre ângulos sucessivos com correção circular: se $\Delta > 180^\circ$, adotamos $360^\circ - \Delta$. Reportamos Δ em graus/frame (convertível a graus/s multiplicando pelo fps).

Anotação humana (ground truth).

A partir das séries (x,y) do DLC, um script identificou janelas com ausência de deslocamento global $\geq 2,0$ s e gerou clips desses trechos. O mesmo script removeu metadados (nome do arquivo, sessão/animal/condição) e aleatorizou a ordem dos clips, garantindo um duplo cego quanto aos contextos A e B, tipos de estímulos (CS-/CS+/US) e sessões.

Dois avaliadores independentes, cegos à condição, assistiram a cada clip e, primeiro, verificaram se de fato não havia movimento detectável. Clips com micromovimentos ou

movimentos fora do plano (p. ex., grooming) foram rotulados como “movimento” e excluídos do conjunto usado para distinguir freezing de imobilidade quieta.

Para os clips aprovados na triagem, os avaliadores classificaram duas classes — freezing (imobilidade defensiva) vs. imobilidade quieta (repouso relaxado) — considerando um conjunto de sinais observáveis: (i) rigidez corporal/tônus postural; (ii) transições bruscas no início/fim do episódio; (iii) sinais compatíveis com sonolência/repouso; (iv) ângulo/estabilidade da cabeça e microajustes posturais; (v) movimento de vibrissas, com ausência ou grande redução em freezing.

As anotações foram feitas em arquivos .csv e, em seguida, comparadas por um código: quando os dois avaliadores concordavam, o rótulo era aceito; nos casos de discordância, a decisão foi atribuída a um terceiro avaliador, gerando o rótulo de consenso por clip.

Resultados e Discussões

Foram analisados vídeos top-down (1080p/30 fps) de $N = 6$ ratos nas sessões gravadas: HAB (Habituation — Habitação), EE (Early Extinction — Extinção inicial), LE (Late Extinction — Extinção tardia), EMR (Extinction Memory Recall — Recuperação da memória de extinção, Contexto B) e AMR (Aversive Memory Recall — Recuperação da memória aversiva, Contexto A); o condicionamento (COND — Conditioning) não foi filmado. Ver Fig. 2 (setup/sincronização) e Fig. 3 (protocolo). A curadoria do tracking após treino do DeepLabCut (DLC) (ver métodos para mais detalhes) utilizou triagem de duas faixas de likelihood ($\geq 0,90$ aceita; $\leq 0,60$ descartada; $0,60-0,90$ elegível a interpolação de até 15 frames). Esses critérios usados para interpolar garantem que o código não “invente” uma trajetória, gerando dados falsos. De acordo com as nossas observações, as principais causas de perda de pontos, após limpeza, foram (1) oclusão desses pontos, (2) grooming, o qual apresenta uma postura mais compacta, parecendo muitas vezes com freezing, quando segue apenas os critérios de velocidade, (3) brilho e iluminação diferentes entre as sessões — especialmente em mudanças de contexto. Esses fatores demandaram mais iterações de treino do DLC.

Em relação ao ground truth feito a partir de análise humana manual, em média, foram gerados cerca de 200 clips (≥ 2 s sem deslocamento global), com $8,5 \pm 15,0$ s por clip. Na triagem manual realizada para um animal, $35,62\% \pm 8,66\%$ dos minutos de vídeo foram rotulados como “movimento” (e, portanto, excluídos do conjunto freezing vs. imobilidade quieta). A concordância entre os dois avaliadores cegos foi de 68% para esse animal. Após limpar, interpolar e analisar os vídeos e seus respectivos clips, o método de limiar simples (ausência de deslocamento global ≥ 2 s) com a anotação manual multissinal (rigidez postural, transições bruscas, estabilidade/ângulo da cabeça, vibrissas), observamos discrepâncias sistemáticas. Para um animal representativo (Fig. 4), observamos as porcentagens de freezing por sessão descritas a seguir: HAB: 53,4% (limiar) vs 11,4% (manual) — $\Delta = +42,0$ p.p.; EE: 68,1% vs 52,2% — $\Delta = +15,9$ p.p.; LE: 63,0% vs 36,6% — $\Delta = +26,4$ p.p.; EMR: 61,9% vs 22,4% — $\Delta = +39,5$ p.p.; AMR: 65,3% vs 23,8% — $\Delta = +41,5$ p.p.

Para esse animal, o limiar simples superestimou freezing em $\approx +33,1$ p.p. (pontos percentuais) ao longo das sessões. A partir das anotações manuais, observamos o padrão esperado do paradigma: freezing elevado durante os dias de evocação da memória aversiva (Dia 03) e posterior redução ao longo dos dias de extinção (Dias 3–4) e tendência à

renovação quando o animal retorna ao contexto A (AMR) após EMR no contexto B. No animal representativo, freezing manual foi 52,2% (EE) → 36,6% (LE) → 22,4% (EMR) → 23,8% (AMR) (Fig. 4). Em consequência desses resultados, nós identificamos dois perfis de erro (i) falsos positivos de freezing em imobilidade quieta/sono (animal parado, sem postura defensiva), e (ii) falsos negativos quando há postura com microajustes de cabeça/vibrissas, que não ultrapassam um limiar de deslocamento corporal. A classificação manual multissinal corrige ambos ao incorporar rigidez corporal, transições bruscas (parada/retomada) e estabilidade angular da cabeça. Dessa forma, as regras operacionais (faixas de likelihood, janela mínima de bout, fusão de eventos), mais features cinemáticas de cabeça/corpo, melhoram a reprodutibilidade entre sessões e contextos. Isso é particularmente relevante com fundo preto (Contexto A), onde o brilho pode afetar o tracking.

Como próximos passos, usaremos o ground truth para treinar um classificador no SimBA, visando replicar as decisões multissinais humanas e superar o limiar simples de forma automatizada. O SimBA é um software que usa modelos de aprendizado profundo clássicos, como por exemplo, o modelo Random Forest, para realizar o cálculo de característica do comportamento, com o auxílio das coordenadas advindas do DLC, gerando classificações comportamentais de acordo com um conjunto de padrões retirados dessas características. O plano é reportar métricas como F1, AUC-PR e AUC-ROC, métricas que mostram o quanto cada característica pode contribuir para o modelo na classificação do comportamento como freezing ou imobilidade. Após análises, percebemos que alguns fatores podem influenciar na qualidade da análise, como, por exemplo, as oclusões de alguns pontos e variações de iluminação entre contextos. Em análises futuras pretendemos registrar respiração, analisar vibrissas de forma dedicada e incluir piloereção, integrando esses sinais ao classificador para um pipeline robusto na detecção do comportamento de freezing.

Conclusão

Os resultados parciais indicam que critérios multissinais (manual, e futuramente automáticos) distinguem freezing de imobilidade quieta com maior fidelidade que limiares baseados apenas em deslocamento corporal, preservando os efeitos esperados do protocolo (condicionamento, extinção, renovação). Isso sustenta a adoção de pipelines reprodutíveis que integrem cabeça/corpo e regras temporais, e pavimentam o caminho para a automação via SimBA.

Referências

ANAGNOSTARAS, S. G. et al. Automated assessment of Pavlovian conditioned freezing and shock reactivity in mice using the VideoFreeze system. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 4, p. 158, 2010. doi:10.3389/fnbeh.2010.00158.

BORKAR, C. D.; FADOK, J. P. A novel Pavlovian fear conditioning paradigm to study freezing and flight behavior. *Journal of Visualized Experiments*, n. 167, e61536, 2021. doi:10.3791/61536.

FANSELOW, M. S.; LESTER, L. S. A functional behavioristic approach to aversively motivated behavior: predatory imminence as a determinant of the topography of defensive

behavior. In: BOLLES, R. C.; BEECHER, M. D. (Eds.). *Evolution and learning*. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, 1988. p. 185-211.

KIM, J. J.; JUNG, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 30, n. 2, p. 188–202, 2006. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.06.005.

MATHIS, A. et al. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nature Neuroscience*, v. 21, n. 9, p. 1281–1289, 2018. doi:10.1038/s41593-018-0209-y.

MIKULOVIC, S. et al. Ventral hippocampal OLM cells control type 2 theta oscillations and response to predator odor. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 363, 2018. doi:10.1038/s41467-018-05907-w.

MILAD, M. R.; QUIRK, G. J. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annual Review of Psychology*, v. 63, p. 129–151, 2012. doi:10.1146/annurev.psych.121208.131631.

NILSSON, S. R. O. et al. Simple Behavioral Analysis (SimBA): an open-source toolkit for computer classification of complex social behaviors in experimental animals. *bioRxiv*, [s. l.], 2020. Preprint. DOI: 10.1101/2020.04.19.049452.

PERUSINI, J. N.; FANSELOW, M. S. Neurobehavioral perspectives on the distinction between fear and anxiety. *Learning & Memory*, v. 22, n. 9, p. 417–425, 2015. doi:10.1101/lm.039180.115.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, v. 106, n. 2, p. 274–285, 1992. doi:10.1037/0735-7044.106.2.274.

POMPILI, M. N.; TODOROVA, R. Discriminating sleep from freezing with cortical spindle oscillations. *Frontiers in Neural Circuits*, v. 16, 783768, 2022. doi:10.3389/fncir.2022.783768.

QUIRK, G. J.; BEER, J. S. Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 16, n. 6, p. 723–727, 2006. doi:10.1016/j.conb.2006.07.004.

QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 1, p. 56–72, 2007. doi:10.1038/sj.npp.1301555.

RESSLER, K. J. et al. Post-traumatic stress disorder: clinical and translational neuroscience from cells to circuits. *Nature Reviews Neurology*, v. 18, n. 5, p. 273–288, 2022. doi:10.1038/s41582-022-00635-8.

SHIN, L. M.; LIBERZON, I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*, v. 35, n. 1, p. 169–191, 2010. doi:10.1038/npp.2009.83.

TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 16, n. 6, p. 317–331, 2015. doi:10.1038/nrn3945.

VANELZAKKER, M. B.; DAHLGREN, M. K.; DAVIS, F. C.; DUBOIS, S.; SHIN, L. M. From Pavlov to PTSD: the extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 113, p. 3–18, 2013. doi:10.1016/j.nlm.2013.11.014.

WILTSCHKO, A. B. et al. Mapping sub-second structure in mouse behavior. *Neuron*, v. 88, n. 6, p. 1121–1135, 2015. doi:10.1016/j.neuron.2015.11.031.

Anexos

Figura 1

Figura 2

Figura 3

Figura 4

CÓDIGO: SB1799

AUTOR: MARINA MARIA DE SOUSA FERREIRA

COAUTOR: ELIAN VICTOR DANDREY GUIMARAES CALDEIRA

COAUTOR: HENNES GENTIL DE ARAÚJO

ORIENTADOR: MARIA BERNARDETE CORDEIRO DE SOUSA

TÍTULO: Análise de sintomas motores e sua possível associação com os níveis de hormônios esteroides sexuais em pacientes com diagnóstico da Doença de Parkinson

Resumo

O presente estudo objetivou caracterizar as alterações motoras em homens e mulheres com Doença de Parkinson (DP), investigando a sua possível correlação com os níveis de hormônios esteroides sexuais. Realizou-se um estudo clínico, observacional e transversal no Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL), em Natal/RN, com 62 pacientes (40 homens e 22 mulheres) com idade entre 35 a 70 anos. Foram aplicados um questionário sociodemográfico e a Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson (MDS-UPDRS), esta última para investigar os sintomas da DP. Os resultados preliminares indicaram predomínio de pacientes no estágio 2 da escala de Hoehn e Yahr, com comprometimento motor significativo na vida diária. Evidenciaram-se dificuldades na escrita (79%), elevada presença de tremores (87,1%) e disfunções em tarefas como alimentação, higiene e movimentos finos. A análise hormonal e a comparação estatística entre os sexos estão em andamento para serem finalizadas brevemente. Conclui-se que os resultados da avaliação preliminar estão de acordo com literatura e identificaram comprometimentos motores relevantes, os quais serão devidamente investigados, de maneira complementar. Nesta etapa adicional se buscará esclarecer se ocorrem diferenças na expressão dos sintomas entre homens e mulheres e se há uma modulação hormonal dos esteroides sexuais na intensidade dos mesmos, de modo a aprofundar a compreensão das bases biológicas da doença.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; Sintomas Motores; Dimorfismo Sexual;

TITLE: Analysis of motor symptoms and their possible association with sex steroid hormone levels in patients diagnosed with Parkinson's disease

Abstract

Analysis of Motor Symptoms and Their Potential Association with Sex Steroid Hormone Levels in Patients with Parkinson's Disease

This study aimed to characterize motor alterations in men and women with Parkinson's disease (PD) and to explore their possible association with sex steroid hormone levels. We

conducted a clinical, observational, cross-sectional study at Onofre Lopes University Hospital (HUOL) in Natal, Rio Grande do Norte, including 62 patients (40 men and 22 women) aged 35 to 70 years. Sociodemographic data were collected, and symptoms were assessed using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS).

Preliminary findings showed that most patients were in stage 2 of the Hoehn and Yahr scale, with significant motor impairments affecting daily activities. The most frequent issues were difficulties in writing (79%), high incidence of tremors (87.1%), and challenges with eating, hygiene, and fine motor tasks. Hormonal analyses and statistical comparisons between sexes are still underway and will be completed shortly.

These early results are consistent with existing literature and confirm significant motor impairments in PD patients. The next phase will investigate whether symptom expression differs between men and women and whether sex steroid hormones modulate symptom severity, contributing to a deeper understanding of the biological mechanisms of the disease.

Keywords: Parkinson's disease; Motor symptoms; Sexual dimorphism;

Introdução

A Doença de Parkinson (DP) é uma enfermidade neurodegenerativa progressiva com relevante impacto na vida do indivíduo, e o seu diagnóstico é identificado na pesquisa da expressão de sintomas motores e não motores e teste de eficácia de levodopa. A sintomatologia motora é caracterizada por tremor de repouso, bradicinesia, rigidez, discinesias e contrações musculares dolorosas (distonias), alterações estas que podem comprometer as ações cotidianas como locomoção, vestuário, a fala e a deglutição. Entre os sinais não motores estão incluídos comprometimento cognitivo e distúrbios do sono REM, dor e distúrbios sensoriais (alucinações), transtornos de saúde mental e demência. (Kouli et al., 2018 ; WHO, 2023).

A descrição clássica da doença remonta a James Parkinson (1817) e, nas décadas seguintes, Jean-Martin Charcot contribuiu ao introduzir o primeiro tratamento farmacológico, uma substância com propriedades anticolinérgicas (Teive, 1998). Com os avanços tecnológicos e clínicos ao longo dos anos, passou-se a reconhecer as predisposições para a DP os principais fatores genéticos e ambientais, e que a sua fisiopatologia decorre da degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra, gerando uma deficiência de dopamina e, como consequência, desregulando as circuitarias que estão relacionadas ao controle fino do movimento. Esse processo culmina em déficits de iniciar e executar o movimento de maneira coordenada (Cerri, Mus, Blandini, 2019; Vegeto et al., 2020; Terrin et. al, 2023). Apesar dos avanços farmacológicos na terapia da DP, o agonista dopaminérgico levodopa é o medicamento mais indicado, apesar de suas particularidades farmacológicas que demonstram que com o tempo há perda na sua eficácia, e possui interações complexas com alimentos e outros medicamentos, seja por sua própria farmacocinética e farmacodinâmica no organismo (LeWitt, 2014).

É fundamental discutir a epidemiologia da DP, visto que, com base em estimativas globais, em 2019, de um total de 8,5 milhões de indivíduos possuem DP, 5,8 milhões de anos de vida foram ajustados por incapacidade (WHO, 2019), com a prevalência para o sexo masculino,

particularmente na faixa etária entre os 50 a 59 anos (Ngo, Steyn e McCombe, 2014; Marogianni et al., 2020). Em contraste, mulheres têm o início da DP em uma média de idade mais tardia, (Cerri, Mus, Blandini, 2019; Terrin et al., 2023) e já foi registrada a presença de dimorfismo tanto em sintomas não motores como motores (Conner et al., 2020, Iwaki et al., 2021 e Kang, Choi e Kim, 2022). Por este prisma, as evidências científicas apontam que a manifestação da DP varia entre os sexos nas alterações clínicas motoras e não motoras, evidenciadas com base no dimorfismo biológico (Russillo et al., 2022; Bianco, Antonacci e Liguori, 2023). Diante disto, esta pesquisa visa investigar se os níveis basais de hormônios esteroides sexuais estão associados ao aumento de sintomas relacionados às alterações motoras em homens e mulheres.

Metodologia

1- Desenho do estudo, amostra e questões éticas

O trabalho de pesquisa foi realizado no ambulatório de neurologia do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL) da UFRN, localizado em Natal/RN. O período de coleta de dados com aplicação de questionários foi até 11 de março de 2025. A amostragem inicial era de aproximadamente 100 voluntários, entretanto, só puderam ser coletados dados de 62 pacientes com diagnóstico de Doença de Parkinson. O estudo clínico observacional, em uma amostra transversal, dentre o total, 22 voluntários eram sexo feminino e do 40 eram sexo masculino, na faixa etária entre 35 anos e 70 anos. Os participantes foram selecionados dentre o total de pacientes do ambulatório neurologia do HUOL, após observados os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos. Em seguida, a apresentação da pesquisa, os voluntários assinaram o “Termo de Conhecimento Livre e Esclarecido” (TCLE), e responderam o questionário de avaliação sociodemográfica e de histórico familiar, assim como a avaliação do questionário MDS-UPDRS por um fisioterapeuta. Vale salientar, que projeto foi habilitado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP-CENTRAL) da UFRN No. do Protocolo: 78246223.4.0000.5537 e No. do Parecer: 6.874.670,

A amostra inicial era de mínimo, de 98 indivíduos de uma população de 130 pessoas, para o grau de confiança de 95%, calculado usando o Software SPSS versão 22.0 com base na população cadastrada com diagnóstico de DP no ambulatório de Neurologia do HUOL. Entretanto, essa amostra teve que ser reduzida, devido a logística dos pacientes e repetição de consultas periódicas a cada 3 ou 6 meses, inviabilizando o acesso a novos pacientes elegíveis. Os critérios de inclusão usados, foram: pacientes adultos de ambos os sexos, a partir de 35 anos até 70 anos com diagnóstico de DP de origem idiopática, sem quaisquer comorbidades neuropsiquiátricas identificadas e com quadros de comorbidades devidamente controlados. Como Critérios de Exclusão foram observados adultos com diagnóstico confirmado de doença de Parkinson com etiologia de lesões por traumatismos e outros tipos de lesões de origem externa; participantes da pesquisa relutantes a realizar as avaliações propostas; pacientes submetidos a cirurgia para estimulação craniana profunda (DBS) e/ou em tratamento medicamentoso com reposição ou suplementação hormonal (hormônios esteroides ou análogos).

2- Procedimento Experimental

Foi aplicada a escala para diagnóstico dos sintomas gerais da DP, selecionados os sintomas motores e também realizada a coleta dos níveis hormonais basais dos esteroides sexuais, entretanto, o projeto ainda se encontra na fase de dosagem hormonal.

a) Foi realizada com auxílio de um fisioterapeuta a Aplicação da Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson (Movement Disorders Society - Unified Parkinson's disease Rating Scale –MDS UPDRS) (Goetz et al., 2008).

b) Dosagem dos esteroides sexuais:

A dosagem ainda será finalizada, foi coletado cerca de 20 mL de amostra de sangue periférico, nos horários entre 08:00 e 10:00h da manhã, e dispensadas em tubos sem anticoagulantes, por profissional farmacêutico e, preferencialmente, por punção das veias basilica, ou mesmo cefálica de um dos braços do paciente braço.

Após a coagulação, as amostras foram centrifugadas a 3.500 rotações por minuto (RPM), por 10 minutos, a 25°C. Em seguida, o soro obtido no sobrenadante foi transferido para microtubos eppendorf (alíquotas de 1 mL). O soro encontra-se armazenado a -80°C para análises posteriores, usando kits comerciais. No dia da dosagem, as amostras serão trazidas para descongelar à temperatura ambiente de 21°C e as alíquotas com o volume necessário ao tipo de ensaio serão utilizadas para quantificar as concentrações de três hormônios esteroides (testosterona, estrógeno e progesterona), utilizando kits comerciais, de imunoenensaio ou quimioluminescência, a depender do equipamento disponível no Laboratório de análises clínicas do HUOLe de acordo com as instruções do fabricante. Serão estabelecidos os níveis basais circulantes de estrógenos e testosterona (homens) e estradiol, progesterona e testosterona (mulheres). Todas as atividades experimentais serão realizadas por pesquisador qualificado e todas as análises serão realizadas em duplicata.

c) Acesso aos prontuários no arquivo do hospital, para a captação de comorbidades, e terapia de antiparkinsonianos utilizada. Foram coletadas as informações sobre a farmacoterapia dos voluntários, e digitados em planilha do excel, bem como, o uso de demais medicamentos utilizados.

3- Análise estatística

Os dados coletados referente aos sintomas motores, foram tabulados em planilhas do excel e, posteriormente, estratificados e analisados de acordo com o sexo. A análise estatística utilizará o teste de t para amostras independentes, com intervalo de confiança de 95% e margem de erro de + ou - 5%.

Análise correlacional de Spearman ou Pearson realizados entre os sexos (masculino e feminino) x tipos de sintomas motores, em função das variáveis apresentarem ou não distribuição normal. Os testes estatísticos utilizam o software SPSS versão 22.0 e os valores de p para os testes serão considerados significativos quando forem menores ou iguais a 0,05%.

Resultados e Discussões

Após a análise geral da amostra dos 62 voluntários, observou-se que a amostra seguiu a prevalência masculina com DP, com 35,48% do sexo feminino e 64,52% do sexo masculino

conforme mostra a literatura (Li et al., 2025). Foi avaliado com um dos principais pontos do questionário motor a escala de estadiamento de Hoehn e Yahr, o qual traduz a gravidade da doença, graus iniciais estão mais associados com uma maior funcionalidade devido ao início da doença, e com sua progressão para os estágios 4 e 5, aumenta o grau de incapacidade e dependência dos indivíduos, diretamente ligado com a disfuncionalidade motora (BARBOSA et al., 2022). Diante dos dados adquiridos, observou-se uma predominância dos pacientes com idade entre 65-69 anos, e com grau de estadiamento 2. É difícil estabelecer uma relação direta com o grau de estadiamento, e sexo biológico, devido até o momento, mas análises estatísticas mais precisas serão realizadas brevemente. A análise estatística inicial sobre o estado motor dos pacientes, para posterior avaliação e equiparação estatística por sexo. Ao verificar diante da aplicação do questionário os “Aspectos Motores de Experiências da Vida Diária (BVD)”, foi observado que 32,26% dos pacientes não apresentaram alterações na fala, e que 30,65% dos pacientes apresentaram alteração de grau 2 na fala, de modo a alterar modulação, volume formando frases não tão claras. Quanto à sialorréia, 56,5% dos pacientes não apresentaram alterações, enquanto 19,4% dos pacientes tiveram um acometimento de grau 2 - salivação durante o sono. Aspectos sobre mastigação e deglutição, pacientes em sua maioria (cerca de 60%) não tiveram alterações, enquanto que quase 25% possuem algum tipo de lentidão ao mastigar ou dificuldade de deglutição mas são autônomos, ademais, relativo a tarefas para comer, 37,1% deles não possuem dificuldade, entretanto, cerca de 50% possuem alterações do tipo 1 ou 2, como lentidão ou necessidade de auxílio ocasionalmente nas tarefas de alimentação.

Não obstante, quando trata-se de vestuário e higiene, 37,1% dos pacientes precisam de auxílio para abotoar botões e outras atividades que requerem o sistema motor fino, outros 19,4% são lentos mas conseguem realizar as atividades sozinhos. Ao realizar atividades de higiene, 58,1% deles são autônomos, e 35,5% são lentos ou precisam de auxílio ocasionalmente. Quando trata-se da escrita, nota-se uma dificuldade mais evidente, 79% dos indivíduos possuem algum tipo de dificuldade com a escrita, destes, 35,5% possuem escrita lenta ou irregular. Relativo a atividades de passatempo, 53,2% possuem dificuldades, com menor prevalência, para indivíduos de grau 2.

Tratando-se sobre aspectos físicos propriamente ditos, é relevante mencionar que 24,19% da amostra possuía tremores de grau 4, e do total, 87,1% apresentavam algum tipo de tremor. Quanto ao ato de virar-se da cama, 35,48% não tem problemas, e do restante, 25,81% se enquadram no grau 4, mais severo. Quanto à marcha e o equilíbrio, 41,94% possuem dificuldades nível 1, e a maioria, 54,84% não possuem bloqueio na marcha. Quanto à rigidez (membros superiores direito, esquerdo, membro inferior direito, membro inferior esquerdo e pescoço) acima de 30% dos pacientes tiveram pelo menos grau 1. No aspecto da fala e expressão facial, destacaram-se predominância de pacientes com grau 1 seguido por grau 2. Adicionalmente, no exercício de bater os dedos, a maioria teve uma alteração de grau 1 ou 2, e no movimento de supinação das mãos, houve uma variação na prevalência de sintomas entre mão direita e mão esquerda de 39% e 50% respectivamente. Vale o recurso de análises estatísticas mais completas para avaliar se há diferença significativa entre o movimento do lado direito e esquerdo, e uma correlação com a dominância lateral dos pacientes.

Essas análises revelam que os participantes da pesquisa apresentam certa dificuldade para realizar as atividades motoras diárias, que deve ser justificada pela iniciação da Doença de Parkinson ocorrer em indivíduos por volta dos 60 anos. Desse modo, se enquadram com a maioria da faixa etária da amostra analisada, coincidindo, então, com as leves alterações do

grau de estadiamento da maioria dos pacientes (Ngo, Steyn e McCombe, 2014; Marogianni et al., 2020).

Conclusão

O presente estudo, até o momento, integrou e analisou as evidências disponíveis sobre os sintomas motores e buscará brevemente analisar sua possível associação com os níveis de hormônios esteroides sexuais em pacientes com diagnóstico da Doença de Parkinson. Devido a limitação do número de pacientes e a logística dos sistemas de colaboração do hospital associado, não foi possível cumprir o cronograma e analisar as dosagens hormonais e a análise estatística equiparada por sexo para os aspectos motores. Entretanto, diante dos resultados obtidos, foi possível caracterizar o perfil da população analisada pelo estudo, e estabelecer relações entre a idade dos pacientes e a gravidade da doença, por meio da análise dos valores de estadiamento e do acometimento dos sintomas motores. Observa-se também, que diante disso, a maioria dos pacientes possuem algum tipo de acometimento, mesmo que leve, e uma possível correlação entre o aumento de sintomas na mão esquerda no movimento das mãos. Vale salientar a importância da análise hormonal e estatística a serem complementadas para o avanço desse estudo e elucidação, com ferramentas mais elaboradas sobre a existência ou não correlações significativas entre a gravidade dos sintomas motores entre homens e mulheres e se os mesmos refletem os níveis basais dos hormônios sexuais.

Referências

- Barbosa, E. R.; Limongi, J.C. , P. Chien, H. F. Barbosa, P. M. Torres, M. R. C. How I treat Parkinson 's disease. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, São Paulo, v. 80, supl. 1, p. 94-104, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/0004-282X-ANP-2022-S126>.
- Bianco A, Antonacci Y, Liguori M. Diferenças de Sexo e Gênero em Doenças Neurodegenerativas: Desafios para Oportunidades Terapêuticas. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 28;24(7):6354.
- Cerri S, Mus L, Blandini F. Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *J Parkinsons Dis*. 2019;9(3):501-515.
- Conner MR, Jang D, Anderson BJ, Kritzer MF. Biological Sex and Sex Hormone Impacts on Deficits in Episodic-Like Memory in a Rat Model of Early, Pre-motor Stages of Parkinson's Disease. *Front Neurol*. 2020;17(11):942.
- Goetz CG, Tilley BC, Shaftman S.R., et al. Movement Disorder Society-Sponsored Revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Scale Presentation and Clinimetric Testing Results. *Movement Disorders*. Vol. 23, No. 15, 2008, pp. 2129–2170.
- Iwaki H, Blauwendraat C, Leonard HL, Makarious MB, Kim JJ, Liu G. Differences in the Presentation and Progression of Parkinson's Disease by Sex. *Mov Disord* 2021;36(1):106-117.
- Kang KW, Choi SM, Kim BC. Gender differences in motor and non-motor symptoms in early Parkinson disease. *Medicine (Baltimore)*. 2022; 21;101(3):e28643.

Kouli A, Torsney KM, Kuan WL. Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. In: Stoker TB, Greenland JC, editors. Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2018 Dec 21. Chapter 1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536722/> doi: 10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.ch1

LI, M.; YE, X.; HUANG, Z.; YE, L.; CHEN, C.; et al. Global burden of Parkinson's disease from 1990 to 2021: a population-based study. *BMJ Open*, v. 15, n. 4, p. e095610, 27 abr. 2025. DOI: 10.1136/bmjopen-2024-095610. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC12035419/>. Acesso em: 01 set. 2025.

Lewitt, PA. Levodopa therapy for Parkinson's disease: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Movement Disorders*, v. 30, n. 1, p. 64–72, 2014. ISSN 0885-3185, 1531-8257. DOI 10.1002/mds.26082.

Marogianni C, Sokratous M, Dardiotis E, Hadjigeorgiou GM, Bogdanos D, Xiromerisiou G. Neurodegeneração e Inflamação - Uma Interação Interessante na Doença de Parkinson. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 10;21(22):8421.

Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol*. 2014;35(3):347-69.

Russillo, MC et al. Sex Differences in Parkinson 's Disease: From Bench to Bedside. *Brain Sciences*, v. 12, n. 7, p. 917, 13. 2022. ISSN 2076-3425. DOI 10.3390/brainsci12070917.

Teive, H, LIO A. G. O papel de Charcot na doença de Parkinson. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, [s. l.], v. 56, p. 141–145, mar. 1998. ISSN 0004-282X, 1678-4227. DOI 10.1590/S0004-282X1998000100026.

Terrin F, Tesoriere A, Plotegher N, Dalla Valle L. Sex and Brain: The Role of Sex Chromosomes and Hormones in Brain Development and Parkinson's Disease. *Cells*. 2023 May 27;12(11):1486.

World Health Organization. parkinson disease. Ago, 2003. Acessado em: 02 de junho de 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/parkinson-disease>.

CÓDIGO: SB1804

AUTOR: MARIA CECÍLIA ALVES DE MEDEIROS

COAUTOR: ELIAN VICTOR DANDREY GUIMARAES CALDEIRA

COAUTOR: GERALDO BEZERRA CAVALCANTI NETO

ORIENTADOR: MARIA BERNARDETE CORDEIRO DE SOUSA

TÍTULO: Plano de Trabalho 2024 INVESTIGAÇÃO SOBRE A SÍNDROME DE BURNOUT, QUALIDADE DA RELAÇÃO FAMILIAR E NÍVEIS BASAIS DE CORTISOL EM ESTUDANTES DO ENSINO MÉDIO

Resumo

A adolescência é marcada por intensas transformações que aumentam a vulnerabilidade dos estudantes às pressões sociais e escolares, favorecendo o risco de burnout, síndrome caracterizada por exaustão emocional, descrença em relação às atividades acadêmicas e baixa eficácia. Este estudo teve como objetivo investigar a associação entre empatia e níveis de cortisol salivar com o burnout em adolescentes do ensino médio. A pesquisa foi realizada em duas escolas públicas de tempo integral em Natal (Brasil), com 95 estudantes (50 do 1º ano e 45 do 3º ano). Foram aplicados o Inventário de Burnout Escolar, escalas de empatia e a mensuração do cortisol salivar como marcador da ativação do eixo HPA. Os resultados apontaram prevalência de burnout em 28,4% dos alunos, com exaustão emocional elevada em 88,4%, descrença em 68,4% e baixa eficácia em 41,1%. A modelagem estatística revelou associação positiva entre descrença e burnout ($\beta = 0,749$) e efeito protetor da eficácia ($\beta = -0,369$; $p = 0,012$). Embora a maioria tenha apresentado níveis moderados a elevados de empatia, esta não se associou significativamente ao burnout. Não foram observadas diferenças por sexo, mas alunos do 3º ano exibiram níveis mais altos de cortisol, relacionados a maior exaustão. Os achados indicam que a sobrecarga acadêmica exerce papel central no desgaste psicológico, reforçando a importância do suporte familiar e escolar como fatores de proteção e da implementação de políticas voltadas à saúde mental de adolescent

Palavras-chave: Saúde Mental, demanda escolar, medidas psicométricas, adolescência

TITLE: Psychophysiological Correlates of Burnout Syndrome in High School Students

Abstract

Adolescence is characterized by intense transformations that increase students' vulnerability to social and academic pressures, heightening the risk of burnout—a syndrome marked by emotional exhaustion, cynicism toward academic activities, and reduced efficacy. This study aimed to investigate the association between empathy and salivary cortisol levels with burnout in high school adolescents. The research was conducted in two full-time public schools in Natal, Brazil, with 95 students (50 from 1st year and 45 from 3rd year). The

School Burnout Inventory, empathy scales, and salivary cortisol measurement as a marker of HPA axis activation were applied. Results indicated a burnout prevalence of 28.4%, with high emotional exhaustion in 88.4%, cynicism in 68.4%, and low efficacy in 41.1% of students. Statistical modeling revealed a positive association between cynicism and burnout ($\beta = 0.749$) and a protective effect of efficacy ($\beta = -0.369$; $p = 0.012$). Although most participants exhibited moderate to high empathy levels, no significant association with burnout was observed. No sex differences were found, but 3rd-year students displayed higher cortisol levels, which were associated with greater exhaustion. These findings indicate that academic overload plays a central role in psychological strain, emphasizing the importance of family and school support as protective factors and the implementation of policies targeting adolescent mental health.

Keywords: Mental Health, School Demands, Psychometric Measures, Adolescence

Introdução

1. Introdução

A adolescência é um período de intensas transformações físicas, cognitivas e emocionais, que tornam os jovens mais suscetíveis aos desafios impostos pelo ambiente social e escolar (Steinberg, 2014). O ensino médio, por ser uma etapa de transição entre a educação básica e o ingresso no mundo acadêmico ou profissional, é frequentemente acompanhado de pressões relacionadas ao desempenho acadêmico, ao convívio social e às expectativas familiares.

Nesse contexto, a síndrome de burnout vem sendo reconhecida como uma condição de risco entre estudantes, caracterizada por exaustão emocional, descrença em relação às atividades escolares e percepção reduzida de eficácia (Schaufeli, Martínez, Pinto, Salanova, & Bakker, 2002; Salmela-Aro et al., 2009). O burnout está associado a prejuízos no rendimento, aumento da evasão escolar e impactos negativos para a saúde mental (May et al., 2015; Fiorilli et al., 2017). Além dos fatores psicossociais, respostas fisiológicas ao estresse, como a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), podem ser avaliadas pelo cortisol salivar, biomarcador sensível às condições de sobrecarga emocional e acadêmica (Adam & Kumari, 2009; Pruessner et al., 2010).

Assim, compreender os correlatos psicofisiológicos e sociais do burnout em adolescentes possibilita não apenas identificar fatores de risco e de proteção, mas também subsidiar intervenções voltadas à promoção da saúde mental escolar.

2. Objetivo

Investigar a associação entre variáveis psicossocial (empatia) e fisiológica (níveis de cortisol salivar) com a síndrome de burnout em estudantes do ensino médio.

Metodologia

3. Metodologia

O estudo foi realizado em duas escolas públicas de ensino médio em tempo integral da cidade de Natal (Brasil), com uma amostra composta por 95 estudantes, sendo 50 do 1º ano e 45 do 3º ano.

3.1 Instrumentos aplicados

Inventário de Burnout Escolar: avaliação das dimensões de exaustão, descrença e eficácia acadêmica. Escalas de empatia: tomada de perspectiva, altruísmo, flexibilidade interpessoal e sensibilidade afetiva. Mensuração fisiológica: coleta de cortisol salivar como marcador da ativação do eixo HPA.

3.2 Procedimentos

Os estudantes responderam questionários sociodemográficos e psicométricos em ambiente escolar reservado. Em seguida, foram coletadas amostras de saliva para análise do cortisol. Os dados foram analisados por estatística descritiva e por modelos de equações estruturais, visando identificar associações entre as variáveis e com valor de $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

4. Resultados

Os principais resultados deste estudo evidenciaram que:

- Prevalência de burnout: 28,4% dos estudantes apresentaram sinais da síndrome, caracterizados por altos escores em exaustão e descrença, combinados com baixa eficácia acadêmica.

- Dimensões do burnout:

Exaustão emocional elevada em 88,4% dos estudantes; Descrença elevada em 68,4%; Baixa eficácia profissional em 41,1%.

- Modelagem estatística: o subdomínio descrença apresentou efeito positivo significativo sobre o burnout ($\beta = 0,749$), enquanto a eficácia apresentou efeito negativo ($\beta = -0,369$; $p = 0,012$).

- Empatia: 72% dos alunos foram classificados como moderadamente empáticos e 27% como empáticos; apenas 1% apresentou baixa empatia. Entretanto, o efeito da empatia sobre o burnout não foi estatisticamente significativo.

- Sexo: não foram observadas diferenças significativas entre meninos e meninas.

- Cortisol: alunos do 3º ano apresentaram níveis significativamente mais elevados, associados a maior exaustão emocional.

5. Discussão

Os achados indicam que a prevalência de burnout escolar entre adolescentes é relevante e merece atenção das instituições de ensino e das famílias. A elevada taxa de exaustão emocional sugere que a sobrecarga acadêmica exerce papel central no desgaste psicológico dos estudantes.

A empatia, embora presente em níveis moderados a elevados na maioria dos estudantes, não apresentou efeito significativo sobre o burnout. Esse resultado sugere que a empatia, apesar de importante para as interações sociais, não atua isoladamente como fator de proteção frente

ao estresse acadêmico (Fiorilli et al., 2017). Estudos demonstram também que o suporte familiar é um fator importante para o tamponamento do burnout em adolescentes (Moreno et al., 2020; Dogan e Dogan, 2023) bem como o ambiente escolar, como o suporte de professores e colegas (Özhan & Yüksel, 2022), o que deverá ser investigado no futuro.

Assim, os dados obtidos reforçam a necessidade de intervenções integradas que envolvam tanto a escola quanto a família, promovendo estratégias de prevenção e mitigação do burnout escolar, alinhando-se às recomendações de políticas públicas de saúde mental para adolescentes (WHO, 2021).

Este estudo demonstrou que aproximadamente um terço dos estudantes do ensino médio apresenta sinais de burnout, com destaque para a exaustão emocional e a descrença acadêmica. O suporte familiar mostrou-se um importante fator de proteção, enquanto o aumento dos níveis de cortisol esteve associado a maior exaustão, especialmente entre alunos do último ano do curso.

Esses resultados destacam a necessidade de políticas e intervenções voltadas para a prevenção do burnout, fortalecendo o apoio familiar e promovendo estratégias de manejo do estresse no ambiente escolar.

Conclusão

Os achados deste estudo indicam que o burnout escolar é prevalente entre adolescentes do ensino médio, afetando aproximadamente um terço dos estudantes, com destaque para exaustão emocional e descrença acadêmica. A empatia, embora presente em níveis moderados a elevados, não se mostrou um fator protetor isolado. O aumento da descrença e a diminuição da eficácia acadêmica destacam-se como determinantes significativos do burnout, enquanto níveis elevados de cortisol, especialmente em alunos do último ano, sugerem associação entre sobrecarga acadêmica e desgaste fisiológico.

Esses resultados reforçam a necessidade de estratégias de prevenção integradas, envolvendo suporte familiar, intervenção escolar e promoção de habilidades de manejo do estresse. Recomenda-se que pesquisas futuras adotem abordagens longitudinais e explorem fatores contextuais, como suporte social, práticas pedagógicas e intervenções socioemocionais. A investigação de biomarcadores de estresse e a análise de fatores moderadores, como empatia e estratégias de enfrentamento, podem ampliar a compreensão dos mecanismos do burnout e subsidiar políticas públicas voltadas à saúde mental de adolescentes.

Referências

- Adam, E. K., & Kumari, M. (2009). Assessing salivary cortisol in large-scale, epidemiological research. *Psychoneuroendocrinology*, 34(10), 1423–1436.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.06.011>
- Dogan DN, Dogan DN (2023). School burnout in secondary and secondary school students: a systematic review. *Conhecimento Divers* 15:159–193.

- Fiorilli, C., De Stasio, S., Di Chiacchio, C., Pepe, A., & Salmela-Aro, K. (2017). School burnout, depressive symptoms and engagement: Their combined effect on student achievement. *International Journal of Educational Research*, 84, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.ijer.2017.04.001>
- May, R. W., Bauer, K. N., & Fincham, F. D. (2015). School burnout: Diminished academic and cognitive performance. *Learning and Individual Differences*, 42, 126–131.
<https://doi.org/10.1016/j.lindif.2015.07.015>
- Moreno, C., Estévez, E., & Murgui, S. (2020). Family climate, peer support, and academic stress in adolescence: Relationship with academic performance and school burnout. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3), 1082.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17031082>
- Özhan MB, Yüksel G (2022). The Effect of School Burnout on Achievement and Well-Being in High School Students: A Holistic Model Proposal. *Int J Contemp Educ Res* 8:145–162
Available at: <https://ijcer.net/index.php/pub/article/view/169>.
- Pruessner, J. C., Dedovic, K., Khalili-Mahani, N., Engert, V., Pruessner, M., Buss, C., ... & Lupien, S. J. (2010). Deactivation of the limbic system during acute psychosocial stress: Evidence from positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging studies. *Biological Psychiatry*, 57(1), 110–119.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.11.015>
- Salmela-Aro, K., Kiuru, N., Leskinen, E., & Nurmi, J. E. (2009). School burnout inventory (SBI): Reliability and validity. *European Journal of Psychological Assessment*, 25(1), 48–57.
<https://doi.org/10.1027/1015-5759.25.1.48>
- Salmela-Aro, K., & Tynkkynen, L. (2012). Gendered pathways in school burnout among adolescents. *Journal of Adolescence*, 35(4), 929–939.
<https://doi.org/10.1016/j.adolescence.2012.01.001>
- Schaufeli, W. B., Martínez, I. M., Pinto, A. M., Salanova, M., & Bakker, A. B. (2002). Burnout and engagement in university students: A cross-national study. *Journal of Cross-Cultural Psychology*, 33(5), 464–481. <https://doi.org/10.1177/0022022102033005003>
- Steinberg, L. (2014). *Age of opportunity: Lessons from the new science of adolescence*. Houghton Mifflin Harcourt.
- World Health Organization (WHO). (2021). Adolescent mental health.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/adolescent-mental-health>
- Zimmer-Gembeck, M. J., & Skinner, E. A. (2011). Review: The development of coping across childhood and adolescence: An integrative review and critique of research. *International Journal of Behavioral Development*, 35(1), 1–17.
<https://doi.org/10.1177/0165025410384923>

Anexos

Figura 8. Box-plots da concentração do cortisol salivar ($\mu\text{g/dL}$) em estudantes do ensino médio ($n = 95$), de acordo com o ano do curso (1= primeiro ano; 3 = terceiro ano). Teste t para amostras independentes, valor-p = 0,0060.

Figura 3. Distribuição percentual dos níveis de empatia dos estudantes do ensino médio ($n = 95$) de acordo com os critérios de classificação (Pouco empático x Empático). Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Figura 4. Distribuição percentual de acordo com os critérios de classificação (Baixo; Médio-baixo; Médio-alto e Alto) do escore geral da variável Empatia e dos seus subdomínios estudantes do ensino médio ($n = 95$). Subdomínios: afetivo consistente, adaptaç

CÓDIGO: SB1814

AUTOR: ELIAN VICTOR DANDREY GUIMARAES CALDEIRA

COAUTOR: MARIA CECÍLIA ALVES DE MEDEIROS

COAUTOR: GERALDO BEZERRA CAVALCANTI NETO

ORIENTADOR: MARIA BERNARDETE CORDEIRO DE SOUSA

TÍTULO: Correlatos psicofisiológicos e sociais da síndrome de burnout em estudantes do ensino médio

Resumo

A adolescência é marcada por intensas transformações que aumentam a vulnerabilidade dos estudantes às pressões sociais e escolares, favorecendo o risco de burnout, síndrome caracterizada por exaustão emocional, descrença em relação às atividades acadêmicas e baixa eficácia. Este estudo teve como objetivo investigar a associação entre empatia e níveis de cortisol salivar com o burnout em adolescentes do ensino médio. A pesquisa foi realizada em duas escolas públicas de tempo integral em Natal (Brasil), com 95 estudantes (50 do 1º ano e 45 do 3º ano). Aplicou-se o Inventário de Burnout Escolar, escalas de empatia e a mensuração do cortisol salivar como marcador da ativação do eixo HPA. Os resultados indicaram prevalência de burnout em 28,4% dos alunos, com exaustão emocional elevada em 88,4%, descrença em 68,4% e baixa eficácia em 41,1%. A modelagem estatística revelou associação positiva entre descrença e burnout ($\beta = 0,749$) e efeito protetor da eficácia ($\beta = -0,369$; $p = 0,012$). Embora a maioria tenha apresentado níveis moderados a elevados de empatia, esta não se associou significativamente ao burnout. Não foram observadas diferenças por sexo, mas alunos do 3º ano exibiram níveis mais altos de cortisol, relacionados a maior exaustão. Os achados indicam que a sobrecarga acadêmica exerce papel central no desgaste psicológico, reforçando a relevância do suporte familiar e escolar como fatores de proteção e da implementação de políticas voltadas à saúde mental de adolescentes.

Palavras-chave: Saúde Mental, demanda escolar, medidas psicométricas, adolescência

TITLE: Psychophysiological Correlates of Burnout Syndrome in High School Students

Abstract

Adolescence is characterized by intense transformations that increase students' vulnerability to social and academic pressures, heightening the risk of burnout—a syndrome marked by emotional exhaustion, cynicism toward academic activities, and reduced efficacy. This study aimed to investigate the association between empathy and salivary cortisol levels with burnout in high school adolescents. The research was conducted in two full-time public schools in Natal, Brazil, with 95 students (50 from 1st year and 45 from 3rd year). The School Burnout Inventory, empathy scales, and salivary cortisol measurement as a marker of HPA axis activation were applied. Results indicated a burnout prevalence of 28.4%, with

high emotional exhaustion in 88.4%, cynicism in 68.4%, and low efficacy in 41.1% of students. Statistical modeling revealed a positive association between cynicism and burnout ($\beta = 0.749$) and a protective effect of efficacy ($\beta = -0.369$; $p = 0.012$). Although most participants exhibited moderate to high empathy levels, no significant association with burnout was observed. No sex differences were found, but 3rd-year students displayed higher cortisol levels, which were associated with greater exhaustion. These findings indicate that academic overload plays a central role in psychological strain, emphasizing the importance of family and school support as protective factors and the implementation of policies targeting adolescent mental health.

Keywords: Mental Health, School Demands, Psychometric Measures, Adolescence

Introdução

1. Introdução

A adolescência é um período de intensas transformações físicas, cognitivas e emocionais, que tornam os jovens mais suscetíveis aos desafios impostos pelo ambiente social e escolar (Steinberg, 2014). O ensino médio, por ser uma etapa de transição entre a educação básica e o ingresso no mundo acadêmico ou profissional, é frequentemente acompanhado de pressões relacionadas ao desempenho acadêmico, ao convívio social e às expectativas familiares.

Nesse contexto, a síndrome de burnout vem sendo reconhecida como uma condição de risco entre estudantes, caracterizada por exaustão emocional, descrença em relação às atividades escolares e percepção reduzida de eficácia (Schaufeli, Martínez, Pinto, Salanova, & Bakker, 2002; Salmela-Aro et al., 2009; Dogan & Dogan, 2023). O burnout está associado a prejuízos no rendimento, aumento da evasão escolar e impactos negativos para a saúde mental (May et al., 2015; Fiorilli et al., 2017). Além dos fatores psicossociais, respostas fisiológicas ao estresse, como a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), podem ser avaliadas pelo cortisol salivar, biomarcador sensível às condições de sobrecarga emocional e acadêmica (Adam & Kumari, 2009; Pruessner et al., 2010).

Assim, compreender os correlatos psicofisiológicos e sociais do burnout em adolescentes possibilita não apenas identificar fatores de risco e de proteção, mas também subsidiar intervenções voltadas à promoção da saúde mental escolar.

2. Objetivo

Investigar a associação entre variáveis psicossocial (empatia) e fisiológica (níveis de cortisol salivar) com a síndrome de burnout em estudantes do ensino médio.

Metodologia

3. Metodologia

O estudo foi realizado em duas escolas públicas de ensino médio em tempo integral da cidade de Natal (Brasil), com uma amostra composta por 95 estudantes, sendo 50 do 1º ano e 45 do 3º ano. Este estudo foi aprovado pelo Comitê Central de ética em pesquisa da UFRN com o CAAE 67960623.8.0000.5537 e número do parecer 6.237.992.

3.1 Instrumentos aplicados

Inventário de Burnout Escolar: avaliação das dimensões de exaustão, descrença e eficácia acadêmica. Escalas de empatia: tomada de perspectiva, altruísmo, flexibilidade interpessoal e sensibilidade afetiva. Mensuração fisiológica: coleta de cortisol salivar como marcador da ativação do eixo HPA.

3.2 Procedimentos

Os estudantes responderam questionários sociodemográficos e psicométricos em ambiente escolar reservado. Em seguida, foram coletadas amostras de saliva para análise do cortisol. Os dados foram analisados por estatística descritiva e por modelos de equações estruturais, visando identificar associações entre as variáveis e com valor de $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

4. Resultados

Os principais resultados deste estudo evidenciaram que:

- Prevalência de burnout: 28,4% dos estudantes apresentaram sinais da síndrome, caracterizados por altos escores em exaustão e descrença, combinados com baixa eficácia acadêmica (Figura 1).

- Dimensões do burnout:

Exaustão emocional elevada em 88,4% dos estudantes; Descrença elevada em 68,4%; Baixa eficácia profissional em 41,1%.

- Modelagem estatística: o subdomínio descrença apresentou efeito positivo significativo sobre o burnout ($\beta = 0,749$), enquanto a eficácia apresentou efeito negativo ($\beta = -0,369$; $p = 0,012$).

- Empatia: 72% dos alunos foram classificados como moderadamente empáticos e 27% como empáticos; apenas 1% apresentou baixa empatia. Entretanto, o efeito da empatia sobre o burnout não foi estatisticamente significativo (Figura 2).

- Sexo: não foram observadas diferenças significativas entre meninos e meninas.

- Cortisol: alunos do 3º ano apresentaram níveis significativamente mais elevados, associados a maior exaustão emocional. (Figura 3).

5. Discussão

Os achados indicam que a prevalência de burnout escolar entre adolescentes é relevante e merece atenção das instituições de ensino e das famílias. A elevada taxa de exaustão emocional sugere que a sobrecarga acadêmica exerce papel central no desgaste psicológico dos estudantes.

A empatia, embora presente em níveis moderados a elevados na maioria dos estudantes, não apresentou efeito significativo sobre o burnout. Esse resultado sugere que a empatia, apesar de importante para as interações sociais, não atua isoladamente como fator de proteção frente ao estresse acadêmico (Fiorilli et al., 2017). Estudos demonstram também que o suporte familiar é um fator importante para o tamponamento do burnout em adolescentes (Moreno et

al., 2020; Dogan e Dogan, 2023) bem como o ambiente escolar, como o suporte de professores e colegas (Özhan & Yüksel, 2022).

Assim, os dados obtidos reforçam a necessidade de intervenções integradas que envolvam tanto a escola quanto a família, promovendo estratégias de prevenção e mitigação do burnout escolar, alinhando-se às recomendações de políticas públicas de saúde mental para adolescentes (WHO, 2021).

Este estudo demonstrou que aproximadamente um terço dos estudantes do ensino médio apresenta sinais de burnout, com destaque para a exaustão emocional e a descrença acadêmica. O suporte familiar mostrou-se um importante fator de proteção, enquanto o aumento dos níveis de cortisol esteve associado a maior exaustão, especialmente entre alunos do último ano do curso.

Esses resultados destacam a necessidade de políticas e intervenções voltadas para a prevenção do burnout, fortalecendo o apoio familiar e promovendo estratégias de manejo do estresse no ambiente escolar.

Conclusão

6. Conclusões

Os achados deste estudo indicam que o burnout escolar é prevalente entre adolescentes do ensino médio, afetando aproximadamente um terço dos estudantes, com destaque para exaustão emocional e descrença acadêmica. A empatia, embora presente em níveis moderados a elevados, não se mostrou um fator protetor isolado. O aumento da descrença e a diminuição da eficácia acadêmica destacam-se como determinantes significativos do burnout, enquanto níveis elevados de cortisol, especialmente em alunos do último ano, sugerem associação entre sobrecarga acadêmica e desgaste fisiológico.

Esses resultados reforçam a necessidade de estratégias de prevenção integradas, envolvendo suporte familiar, intervenção escolar e promoção de habilidades de manejo do estresse. Recomenda-se que pesquisas futuras adotem abordagens longitudinais e explorem fatores contextuais, como suporte social, práticas pedagógicas e intervenções socioemocionais. A investigação de biomarcadores de estresse e a análise de fatores moderadores, como empatia e estratégias de enfrentamento, podem ampliar a compreensão dos mecanismos do burnout e subsidiar políticas públicas voltadas à saúde mental de adolescentes.

Referências

Adam, E. K., & Kumari, M. (2009). Assessing salivary cortisol in large-scale, epidemiological research. *Psychoneuroendocrinology*, 34(10), 1423–1436.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.06.011>

Dogan DN, Dogan DN (2023). School burnout in secondary and secondary school students: a systematic review. *Conhecimento Divers* 15:159–193.

Fiorilli, C., De Stasio, S., Di Chiacchio, C., Pepe, A., & Salmela-Aro, K. (2017). School burnout, depressive symptoms and engagement: Their combined effect on student achievement. *International Journal of Educational Research*, 84, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.ijer.2017.04.001>

Moreno, C., Estévez, E., & Murgui, S. (2020). Family climate, peer support, and academic stress in adolescence: Relationship with academic performance and school burnout. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3), 1082.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17031082>

Özhan MB, Yüksel G (2022). The Effect of School Burnout on Achievement and Well-Being in High School Students: A Holistic Model Proposal. *Int J Contemp Educ Res* 8:145–162
Available at: <https://ijcer.net/index.php/pub/article/view/169>.

Pruessner, J. C., Dedovic, K., Khalili-Mahani, N., Engert, V., Pruessner, M., Buss, C., ... & Lupien, S. J. (2010). Deactivation of the limbic system during acute psychosocial stress: Evidence from positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging studies. *Biological Psychiatry*, 57(1), 110–119.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.11.015>

Salmela-Aro, K., Kiuru, N., Leskinen, E., & Nurmi, J. E. (2009). School burnout inventory (SBI): Reliability and validity. *European Journal of Psychological Assessment*, 25(1), 48–57.
<https://doi.org/10.1027/1015-5759.25.1.48>

Salmela-Aro, K., & Tynkkynen, L. (2012). Gendered pathways in school burnout among adolescents. *Journal of Adolescence*, 35(4), 929–939.
<https://doi.org/10.1016/j.adolescence.2012.01.001>

Schaufeli, W. B., Martínez, I. M., Pinto, A. M., Salanova, M., & Bakker, A. B. (2002). Burnout and engagement in university students: A cross-national study. *Journal of Cross-Cultural Psychology*, 33(5), 464–481. <https://doi.org/10.1177/0022022102033005003>

Steinberg, L. (2014). *Age of opportunity: Lessons from the new science of adolescence*. Houghton Mifflin Harcourt.

World Health Organization (WHO). (2021). Adolescent mental health.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/adolescent-mental-health>

Anexos

Figura 1. Distribuição percentual dos níveis em cada domínio (%) dos sintomas de burnout por critério de classificação (Descrença, Eficácia profissional e Exaustão emocional) em estudantes adolescentes do ensino médio (n = 95). Critérios de classificação

Figura 2. Distribuição percentual dos níveis de empatia dos estudantes do ensino médio (n = 95) de acordo com os critérios de classificação (Pouco empático x Empático). Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Figura 3. Box-plots da concentração do cortisol salivar ($\mu\text{g/dL}$) em estudantes do ensino médio ($n = 95$), de acordo com o ano do curso (1= primeiro ano; 3 = terceiro ano). Teste t para amostras independentes, valor-p = 0,0060.