

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**REVISITANDO OS MECANISMOS DE MODULAÇÃO
NORADRENÉRGICA SOBRE AS MEMÓRIAS DE MEDO: DO
FISIOLÓGICO AO DISFUNCIONAL**

LUCAS GAZARINI

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Bertoglio

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gazarini, Lucas

Revisitando os mecanismos de modulação noradrenérgica
sobre as memórias de medo : do fisiológico ao disfuncional /
Lucas Gazarini ; orientador, Leandro José Bertoglio -
Florianópolis, SC, 2015.
204 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Memória. 3. Noradrenalina. 4.
Hipocampo. 5. Generalização do medo. I. Bertoglio, Leandro
José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

“Revisitando os mecanismos de modulação noradrenérgica sobre a memória de medo: do fisiológico ao funcional”

Por

Lucas Gazarini

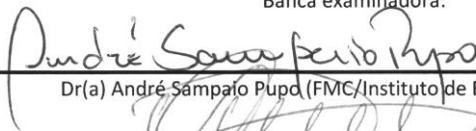
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (004/FMC/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:



Dr(a) Leandro José Bertoglio (FMC/CCB/UFSC)

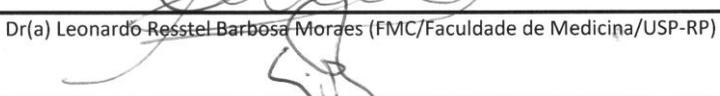
Banca examinadora:



Dr(a) André Sampaio Pupo (FMC/Instituto de Biociências/UNESP)



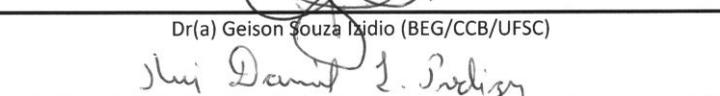
Dr(a) Leonardo Resstel Barbosa Moraes (FMC/Faculdade de Medicina/USP-RP)



Dr(a) Giles Alexander Rae (FMC/CCB/UFSC)



Dr(a) Geison Souza Laidio (BEG/CCB/UFSC)



Dr(a) Rui Daniel Schröder Prediger (FMC/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Farmacologia

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vanderlei e Ivanir, pelo esforço e apoio constantes para que eu pudesse prosseguir com a minha formação, bem como pelas influências positivas para a construção do meu caráter e educação. À minha irmã, Janaina, pela companhia desde sempre, conselhos e compreensão.

Ao professor Leandro José Bertoglio, pela disposição em me orientar na realização desse trabalho e me acompanhar ao longo dos últimos anos. Aos professores André Pupo, Leonardo Resstel, Giles Rae, Rui Prediger, Geison Izídio e Marcelo Giachero por aceitarem o convite para compor a banca e pela colaboração no aperfeiçoamento desse trabalho.

Aos professores Reinaldo Takahashi, José Eduardo dos Santos, Jamil Assreuy, Thereza Christina Monteiro de Lima, Antônio de Pádua Carobrez e Áurea Elizabeth Linder por disponibilizarem seus laboratórios e ajudarem no que foi necessário. Aos demais professores da Pós-Graduação em Farmacologia pela contribuição na minha formação. À professora Rúbia Weffort de Oliveira pelos ensinamentos, aconselhamento, apoio constante, confiança e amizade.

Aos meus colegas de departamento Ju Kroon, Priscila, Claudini, Angélica e Dai, pelos momentos bons, diversão, ideias e sugestões. Aos companheiros de laboratório Ana Carol, Cris Stern, Marina e Rafael, pela amizade, paciência, disposição e trabalho em conjunto, além de tudo que me ensinaram. Aos alunos de Iniciação científica que passaram pelo laboratório e contribuíram de alguma maneira. Aos meus amigos Karla, Wesley e Jeanne e ao pessoal do AD.

À Adriane Madeira e funcionários do LAMEB II pelo apoio técnico e à Karla, Regina e René pela ajuda com os ensaios cardiovasculares. Aos funcionários do departamento e demais colegas da pós-graduação, bem como a todos os que, de alguma maneira, colaboraram no andamento desse trabalho.

À *'International Brain Research Organization'*, *'The Grass Foundation'* e *'Society for Neuroscience'* pelas oportunidades oferecidas. À CAPES, CNPq, FAPESP e FAPESC, pelo apoio financeiro.

“O indivíduo sempre teve que lutar para não ser dominado pelo coletivo. Ao fazer isso, você ficará sozinho com frequência e, às vezes, assustado. Contudo, o privilégio de ser você mesmo não tem preço.”

— **Friedrich Nietzsche**

RESUMO

O sistema noradrenérgico é implicado tradicionalmente no processamento das memórias emocionais por meio da ativação de receptores α_1 - e β -adrenérgicos. Embora a hiperativação noradrenérgica possa induzir a formação de memórias inapropriadas que levam ao desenvolvimento do transtorno do estresse pós-traumático, a maior parte dos estudos se limita à investigação do papel dessa via sobre as memórias de medo “fisiológicas”. Esse trabalho teve como proposta investigar possíveis divergências quanto ao recrutamento de receptores adrenérgicos durante as fases de estabilização de memórias de medo, se estendendo do espectro normal ao disfuncional, que poderiam ser modeladas em roedores frente à hiperativação noradrenérgica em diferentes condições. O aumento do tônus noradrenérgico induzido pela ioimbina potencializou tanto a consolidação quanto a reconsolidação de uma memória de medo contextual fraca. Embora ambos os processos recrutem receptores β -adrenérgicos centrais, a participação do subtipo α_1 só foi evidente durante a reconsolidação, destacando a natureza distinta entre as duas fases de estabilização em memórias normais. Frente ao condicionamento contextual mais intenso, a ioimbina gerou uma memória disfuncional acompanhada de generalização do medo, sendo que a indução desse perfil dependeu exclusivamente da ativação de receptores β -adrenérgicos centrais. Como a generalização do medo é uma característica evidente do transtorno do estresse pós-traumático, a possibilidade de modelar memórias disfuncionais e outras características inapropriadas que teriam mais relevância para esse transtorno psiquiátrico foi avaliada. A hiperativação noradrenérgica após o condicionamento de medo contextual intenso induziu não só a generalização do medo persistente (28 dias), mas também sensibilização de respostas defensivas, aumento na pressão arterial, resistência à extinção, ao efeito antiaversivo de benzodiazepínicos e ao efeito amnésico da clonidina e do canabidiol sobre a reconsolidação, efeitos relacionados à superconsolidação da memória de medo. O efeito de agentes amnésicos sobre a reconsolidação foi recuperado frente à facilitação da labilização da memória, revertendo a expressão de medo generalizada. A indução dessa característica disfuncional depende da ativação de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos presentes no hipocampo dorsal, embora somente a ativação dos receptores β_3 -adrenérgicos induza a generalização do medo pelo recrutamento subsequente da via do óxido nítrico. Além de expandir o conhecimento acerca da modulação noradrenérgica sobre o processamento de memórias de medo

normais, esses resultados implicam o envolvimento noradrenérgico, com consequente recrutamento de diferentes subtipos desses receptores no cérebro, no estabelecimento de memórias disfuncionais, com maior relevância translacional no entendimento das memórias traumáticas que levariam ao surgimento de transtornos psiquiátricos.

Palavras-chave: noradrenalina, generalização do medo, hipocampo dorsal, transtorno do estresse pós-traumático, consolidação, reconsolidação.

ABSTRACT

The noradrenergic system is classically implicated in emotional memory processing through the activation of α_1 - and β -adrenoceptors. Even though noradrenergic hyperactivation may lead to the formation of inappropriate memories that might underlie posttraumatic stress disorder, most studies investigate the role of this transmission system on “physiological” fear memories only. The purpose of this study was to investigate possible divergences related to the recruitment of adrenergic receptors during stabilization steps of fear memory, extending from normal to dysfunctional spectrum, which might be modeled in rodents by noradrenergic hyperactivation under different experimental conditions. Increased noradrenergic tonus induced by yohimbine potentiated the consolidation and reconsolidation of a weak contextual fear memory. Although both processes recruit central β -adrenoceptors, the involvement of the α_1 subtype was only detected during reconsolidation, highlighting the distinct nature of both stabilization phases of adaptive memories. Under stronger contextual fear conditioning, yohimbine induced a dysfunctional memory with fear generalization, a condition that depended exclusively on the activation of central β -adrenoceptors. As fear generalization is a typical feature of posttraumatic stress disorder, the possibility of modelling dysfunctional memories and other inappropriate related features that would be relevant to this psychiatric condition was evaluated. The noradrenergic hyperactivation induced after a strong contextual fear conditioning not only induced persistent fear generalization (28 days), but also caused sensitization of defensive responses, increased blood pressure and resistance to extinction, to the antiaversive effect of benzodiazepines and to the amnesic effect of clonidine and cannabidiol on reconsolidation, effects that may be linked to fear memory overconsolidation. The effect of amnesic drugs on reconsolidation was rescued after the facilitation of memory labilization, reverting the fear generalization profile. The induction of this dysfunctional feature relies on the activation of β_2 - and β_3 -adrenoceptors in the dorsal hippocampus, even though only β_3 -adrenoceptors induced fear generalization by the recruitment of the nitric oxide pathway. Besides expanding the knowledge related to noradrenergic modulation during the processing of adaptive fear memories, such results implicate the involvement of the noradrenergic system with consequent recruitment of different adrenoceptor subtypes in the brain in the establishment of dysfunctional memories, which present higher translational relevance for the

understanding of traumatic memories that might lead to the development of psychiatric disorders.

Keywords: noradrenaline, fear generalization, dorsal hippocampus, post-traumatic stress disorder, consolidation, reconsolidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de formação das memórias de longa duração.....	30
Figura 2. A reconsolidação como uma nova etapa de estabilização das memórias.....	33
Figura 3. Familiarização ao contexto e associação com o estímulo incondicionado.....	37
Figura 4. Evocação e verificação da especificidade das memórias de medo.....	37
Figura 5. Indução da reconsolidação ou extinção da memória de medo contextual.....	39
Figura 6. O eixo simpatoadrenomedular/ <i>locus coeruleus</i>	46
Figura 7. Classificação dos subtipos de receptores adrenérgicos e principais vias de transdução.....	47
Figura 8. A ioimbina potencializa a consolidação da memória.....	55
Figura 9. A ioimbina tem efeito tipo-ansiógênico no labirinto em cruz elevado.....	56
Figura 10. A ioimbina potencializa a reconsolidação da memória.....	59
Figura 11. A clonidina prejudica a consolidação da memória.....	62
Figura 12. A clonidina prejudica a reconsolidação da memória.....	63
Figura 13. Os receptores β -adrenérgicos são necessários para o efeito da ioimbina sobre a consolidação da memória.....	65
Figura 14. A ativação de receptores α_1 - e β -adrenérgicos é necessária para o efeito da ioimbina sobre a reconsolidação da memória.....	66
Figura 15. A potencialização sequencial da consolidação e reconsolidação da memória induz generalização do medo.....	70

Figura 16. A potencialização consecutiva da reconsolidação da memória aumenta a expressão de congelamento frente ao contexto pareado.....	71
Figura 17. Após atingir níveis máximos de congelamento, a potencialização da reconsolidação da memória induz generalização do medo.....	73
Figura 18. A generalização do medo induzida pela ioimbina durante a consolidação de uma memória intensa requer a ativação de receptores β -adrenérgicos.....	74
Figura 19. A generalização do medo induzida pela ioimbina durante a reconsolidação de uma memória intensa requer a ativação de receptores β -adrenérgicos.....	75
Figura 20. A teoria assintótica da generalização do medo.....	83
Figura 21. A potencialização noradrenérgica dentro da janela de consolidação causa generalização do medo.....	98
Figura 22. A generalização do medo induzida pela ioimbina é de longa duração.....	99
Figura 23. A generalização do medo persiste por, no mínimo, 29 dias.....	101
Figura 24. A memória inapropriada é mais resistente à extinção..	103
Figura 25. A D-cicloserina facilita a extinção da memória, mas não reverte a generalização do medo.....	105
Figura 26. A memória inapropriada torna os animais resistentes ao efeito antiaversivo do midazolam.....	107
Figura 27. A memória inapropriada é resistente ao efeito de agentes amnésicos sobre a reconsolidação.....	109
Figura 28. A D-cicloserina torna a memória inapropriada sensível ao efeito amnésico de drogas sobre a reconsolidação.....	110
Figura 29. A ativação de receptores β -adrenérgicos centrais levam à formação da memória inapropriada.....	111

Figura 30. A generalização do medo acompanha aumentos na pressão sistólica.....	112
Figura 31. A memória inapropriada acompanha sensibilização das respostas defensivas.....	114
Figura 32. O circuito trisináptico de fluxo de informação.....	126
Figura 33. A via do óxido nítrico.....	130
Figura 34. Análise histológica das microinjeções no hipocampo dorsal.....	136
Figura 35. A superconsolidação da memória aumenta a expressão de Arc no hipocampo dorsal.....	138
Figura 36. A estimulação de receptores β -adrenérgicos no hipocampo dorsal durante a consolidação induz a generalização do medo.....	140
Figura 37. O bloqueio de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos hipocampais previne a generalização do medo induzida pela ioimbina.....	142
Figura 38. A estimulação de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos no hipocampo dorsal induz a generalização do medo.....	143
Figura 39. A generalização do medo induzida pela hiperativação adrenérgica depende da transmissão nitrérgica no hipocampo dorsal.....	144
Figura 40. A ativação de receptores β -adrenérgicos no hipocampo dorsal promove o recrutamento da via nitrérgica e causa generalização do medo.....	145
Figura 41. A ativação de receptores β_3 -adrenérgicos no hipocampo dorsal recruta a via nitrérgica e induz generalização do medo.....	147
Figura 42. A estimulação da via nitrérgica hipocampal durante a consolidação induz a generalização do medo.....	148
Figura 43. A hiperativação noradrenérgica induz a generalização do medo pelo recrutamento de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos presentes no hipocampo dorsal.....	164

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. A ioimbina não age como um estímulo incondicionado.	57
Tabela 2. O pareamento com um choque leva à formação de um traço de memória que pode ser potencializado pela ioimbina.....	58
Tabela 3. A ioimbina não apresenta efeito quando administrada 6 h após o treino.....	58
Tabela 4. O efeito da ioimbina sobre a reconsolidação da memória depende da sua evocação/reactivação prévia.....	60
Tabela 5. A ioimbina não apresenta efeito quando administrada 6 h após a reativação da memória.....	61
Tabela 6. A clonidina não interfere com a ansiedade e a atividade exploratória geral no labirinto em cruz elevado.....	64
Tabela 7. O efeito da ioimbina na consolidação depende da ativação central de receptores β -adrenérgicos.....	68
Tabela 8. O efeito da ioimbina na reconsolidação depende da ativação central de receptores β -adrenérgicos.....	69
Tabela 9. O treino com 3 choques leva à expressão máxima de congelamento no contexto pareado.....	98
Tabela 10. A generalização do medo não depende da exposição prévia ao contexto pareado.....	100
Tabela 11. A D-cicloserina facilita a aquisição da memória de extinção.....	106
Tabela 12. A D-cicloserina não apresenta efeito <i>per se</i> sobre a memória de medo contextual.....	109
Tabela 13. A generalização do medo é consequência da potencialização noradrenérgica durante a consolidação da memória.....	113

Quadro 1. Diferenças quanto à expressão, afinidade e potência dos subtipos de receptores β -adrenérgicos no hipocampo de ratos.	128
Tabela 14. Número absoluto de células positivas para Arc no hipocampo dorsal.....	139
Tabela 15. A estimulação de receptores β -adrenérgicos do hipocampo dorsal potencializa a consolidação da memória de medo contextual fraca.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%EBA	–	Porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE
%TBA	–	Porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE
7NI	–	7-nitroindazol, inibidor seletivo da óxido nítrico sintase neuronal
8-Br-GMPc	–	Análogo sintético do GMPc
ADR	–	Adrenalina, agonista de receptores adrenérgicos
AMPc	–	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	–	Análise de variância
Arc	–	Arg3.1 ou proteína associada ao citoesqueleto regulada por ativação, ' <i>activity-regulated cytoskeleton-associated albumin</i> '
ATE	–	Atenolol, antagonista seletivo de receptores β_1 -adrenérgicos
BSA	–	Albumina sérica bovina, do inglês ' <i>bovine serum protein</i> '
BUT	–	Butoxamina, antagonista seletivo de receptores β_2 -adrenérgicos
CB	–	Receptores canabinoides, CB ₁ ou CB ₂
CBD	–	Canabidiol, agonista indireto de receptores canabinoides
CBT	–	Clenbuterol, agonista seletivo de receptores β_2 -adrenérgicos
CL	–	CL316243, agonista seletivo de receptores β_3 -adrenérgicos
CLO	–	Clonidina, agonista de receptores α_2 -adrenérgicos
CS	–	Estímulo condicionado, do inglês ' <i>conditioned stimulus</i> '
DAB	–	3'3'-diaminobenzidina
DCS	–	D-cicloserina, agonista parcial de receptores glutamatérgicos NMDA
EBF	–	Entradas nos braços fechados do LCE
EPM	–	Erro padrão da média
GABA	–	Ácido γ -aminobutírico
GCs	–	Guanilil ciclase solúvel
GD	–	Giro denteado
G _i	–	Proteína G inibitória
GMPc	–	Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
G _q	–	Proteína G estimulatória do tipo q
G _s	–	Proteína G estimulatória do tipo s

HD	– Hipocampo dorsal
HPA	– Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
IOI	– Ioimbina, antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos
ISO	– Isoproterenol, agonista de receptores β -adrenérgicos
L-ARG	– L-arginina, substrato da enzima óxido nítrico sintase
LC	– <i>Locus coeruleus</i>
LCE	– Labirinto em cruz elevado
LTP	– Potenciação de longa duração, do inglês ' <i>long-term potentiation</i> '
MDZ	– Midazolam, agonista do sítio benzodiazepínico de receptores GABA _A
NAD	– Nadolol, antagonista de receptores β -adrenérgicos
NMDA	– N-metil-D-aspartato
nNOS	– Óxido nítrico sintase neuronal
NO	– Óxido nítrico
NOR	– Noradrenalina, agonista de receptores adrenérgicos
NPS	– Nitroprussiato de sódio, doador de óxido nítrico
ODQ	– Inibidor seletivo da guanilil ciclase sensível ao óxido nítrico
PAR	– Posturas de avaliação de risco, posturas de estiramento no LCE
PBS	– Solução salina tamponada com fosfato, ' <i>phosphate buffered saline</i> '
PRAZ	– Prazosin, antagonista seletivo de receptores α_1 -adrenérgicos
PROP	– Propranolol, antagonista de receptores β -adrenérgicos
PTSD	– Transtorno do estresse pós-traumático, do inglês ' <i>post-traumatic stress disorder</i> '
SAM	– Eixo simpatoadrenomedular
SIL	– Sildenafil, inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo 5
SR	– SR59230A, antagonista seletivo de receptores β_3 -adrenérgicos
US	– Estímulo incondicionado, do inglês ' <i>unconditioned stimulus</i> '
VEI	– Veículo

SUMÁRIO

PREFÁCIO	25
1 O PROCESSAMENTO DINÂMICO DAS MEMÓRIAS	27
1.1 A formação das memórias: a teoria clássica da consolidação	29
1.2 A plasticidade neuronal na formação das memórias	31
1.3 Retomando o que foi memorizado: o caso da reconsolidação	32
1.4 O estudo empírico das memórias: o condicionamento clássico pavloviano	35
2 A MODULAÇÃO NORADRENÉRGICA DAS MEMÓRIAS DE MEDO: UMA QUESTÃO DE INTENSIDADE	41
2.1 INTRODUÇÃO	43
2.1.1 <i>A modulação noradrenérgica sobre as memórias emocionais</i> .	44
2.1.2 <i>Os receptores adrenérgicos no processamento das memórias</i> .	46
2.2 HIPÓTESE E OBJETIVOS	50
2.2.1 <i>Objetivo Geral</i>	50
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	51
2.3.1 <i>Animais</i>	51
2.3.2 <i>Drogas</i>	51
2.3.3 <i>Condicionamento de medo contextual</i>	52
2.3.4 <i>Labirinto em cruz elevado</i>	53
2.3.5 <i>Análises estatísticas</i>	54
2.4 RESULTADOS	54
2.4.1 <i>A ioimbina facilita a consolidação da memória de medo</i>	54
2.4.2 <i>A ioimbina facilita a reconsolidação da memória de medo</i>	58
2.4.3 <i>A ativação de receptores α_2-adrenérgicos prejudica as fases de estabilização da memória de medo</i>	61
2.4.4 <i>Existe um recrutamento diferencial dos receptores α_1- e β-adrenérgicos durante a consolidação e reconsolidação de uma memória adaptativa</i>	64
2.4.5 <i>A facilitação noradrenérgica repetida da memória de medo pode causar generalização</i>	69
2.4.6 <i>A generalização do medo requer a ativação de receptores β-adrenérgicos</i>	73
2.5 DISCUSSÃO	76
2.5.1 <i>A modulação noradrenérgica sobre as etapas de estabilização de memórias aversivas normais</i>	76
2.5.2 <i>A modulação noradrenérgica na formação de memórias inapropriadas</i>	81

2.6 CONCLUSÕES.....	85
3 MODELANDO MEMÓRIAS INAPROPRIADAS COM A HIPERATIVACÃO NORADRENÉRGICA.....	87
3.1 INTRODUÇÃO.....	89
3.1.1 Disfunção noradrenérgica no PTSD.....	89
3.1.2 O desafio de modelar memórias traumáticas: o abismo entre o fisiológico e o disfuncional.....	92
3.2 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	93
3.2.1 Objetivo Geral.....	93
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	94
3.3.1 Animais.....	94
3.3.2 Drogas.....	94
3.3.3 Condicionamento de medo contextual.....	95
3.3.4 Labirinto em cruz elevado.....	95
3.3.5 Pletismografia caudal para medida indireta da pressão sistólica.....	96
3.3.6 Análises estatísticas.....	96
3.4 RESULTADOS.....	97
3.4.1 A estimulação noradrenérgica restrita à janela de consolidação induz a generalização do medo.....	97
3.4.2 A generalização do medo tem perfil duradouro.....	98
3.4.3 A memória inapropriada é mais resistente à extinção.....	102
3.4.4 A memória inapropriada é resistente ao efeito antiaversivo do midazolam.....	106
3.4.5 A memória traumática induzida pela hiperativação noradrenérgica é menos susceptível à labilização.....	107
3.4.6 O recrutamento central de receptores β -adrenérgicos sustenta a superconsolidação da memória.....	111
3.4.7 A memória inapropriada induz aumentos na pressão arterial.....	112
3.4.8 A memória de medo inapropriada leva à sensibilização.....	113
3.5 DISCUSSÃO.....	115
3.6 CONCLUSÕES.....	122
4 O ENVOLVIMENTO HIPOCAMPAL NA GENERALIZAÇÃO DO MEDO: ALÉM DA TRANSMISSÃO NORADRENÉRGICA.....	123
4.1 INTRODUÇÃO.....	125
4.1.1 O hipocampo dorsal como figura central na formação das memórias.....	125
4.1.2 Os diferentes subtipos de receptores β -adrenérgicos no hipocampo.....	128

4.2 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	131
4.2.1 <i>Objetivo Geral.....</i>	<i>131</i>
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS	131
4.3.1 <i>Animais.....</i>	<i>131</i>
4.3.2 <i>Drogas.....</i>	<i>132</i>
4.3.3 <i>Condicionamento contextual de medo.....</i>	<i>132</i>
4.3.4 <i>Análise da expressão de Arc.....</i>	<i>133</i>
4.3.5 <i>Procedimentos para injeção central.....</i>	<i>134</i>
4.3.6 <i>Análises estatísticas.....</i>	<i>137</i>
4.4 RESULTADOS	137
4.4.1 <i>A hiperativação noradrenérgica aumenta a expressão de Arc no hipocampo dorsal.....</i>	<i>137</i>
4.4.2 <i>A estimulação de receptores β-adrenérgicos no hipocampo dorsal é suficiente para induzir generalização do medo.....</i>	<i>139</i>
4.4.3 <i>A generalização do medo depende da ativação de receptores β_2-e β_3-adrenérgicos no hipocampo dorsal.....</i>	<i>141</i>
4.4.4 <i>A generalização do medo induzida pela ativação noradrenérgica depende do recrutamento da via nitrérgica no hipocampo dorsal.....</i>	<i>143</i>
4.4.5 <i>O recrutamento nitrérgico no hipocampo dorsal é consequência da ativação de receptores β_3-adrenérgicos.....</i>	<i>146</i>
4.4.6 <i>A ativação da via nitrérgica no hipocampo dorsal é suficiente para induzir generalização do medo.....</i>	<i>146</i>
4.5 DISCUSSÃO	148
4.5.1 <i>A participação de receptores β-adrenérgicos hipocampais na generalização do medo.....</i>	<i>148</i>
4.5.2 <i>A ativação noradrenérgica recruta a via nitrérgica no hipocampo dorsal.....</i>	<i>155</i>
4.6 CONCLUSÕES.....	158
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	161
6 REFERÊNCIAS	169
6.1 Produção relacionada.....	204

PREFÁCIO

Esse trabalho foi desenvolvido a partir de um projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, em abril de 2011, para o ingresso no curso de doutorado. Geralmente, uma tese de doutorado não costuma ser um reflexo fiel da sua proposta inicial. Esse caso não é diferente. Esse trabalho foi desenhado gradualmente, ganhando uma cara própria e restringindo os assuntos focados conforme novos resultados eram obtidos. Por conta disso, somado a questões didáticas, o texto que segue foi dividido em 5 capítulos, a fim de facilitar o entendimento e permitir a assimilação gradual dos resultados, da mesma maneira como eles foram obtidos.

O **capítulo 1** tem como foco a neurobiologia e dinâmica de formação das memórias, e é composta por uma revisão de conceitos necessários para entender o seu processamento. Seu conteúdo se estende desde o histórico de descobertas importantes nesse campo, passando desde o conhecimento atual sobre as várias etapas da memória até o uso do condicionamento contextual de medo como ferramenta para o estudo de memórias de caráter aversivo em roedores. Esse capítulo teórico compõe a base necessária para os 3 capítulos experimentais que o seguem.

O foco do **capítulo 2** é o envolvimento da transmissão noradrenérgica nas memórias aversivas, especialmente durante a sua consolidação e reconsolidação. Após uma breve introdução teórica, uma série de experimentos é exposta, abrangendo a modulação noradrenérgica sobre as memórias de medo de caráter normal, bem como o recrutamento de subtipos de receptores adrenérgicos envolvidos nesses processos. Por fim, os resultados se estendem à participação noradrenérgica no desenvolvimento de memórias aversivas disfuncionais.

A proposta do **capítulo 3** é estender o conhecimento de características disfuncionais que acompanham uma memória de medo inapropriada gerada por meio da hiperativação noradrenérgica, embasando a proposta de um modelo para a indução de uma memória traumática que se assemelhe mais com aquela associada a alguns transtornos psiquiátricos do que as comumente utilizadas em condições pré-clínicas.

No **capítulo 4** há o aprofundamento de aspectos neurobiológicos e farmacológicos relacionados a apenas uma dessas características disfuncionais, a generalização do medo. Para tanto, os

experimentos compreendem desde a demonstração da participação hipocampal até à determinação de subtipos específicos de receptores adrenérgicos envolvidos nessa resposta e algumas das possíveis vias efectoras, como a do óxido nítrico.

Por fim, o **capítulo 5** compreende considerações finais e perspectivas futuras. Ao final desses cinco capítulos, espera-se que o leitor consiga compreender não apenas os assuntos abordados, mas também a linha de pensamento que norteou o desenvolvimento gradual do desenho experimental adotado em cada uma das etapas. Ao mesmo tempo, cada um dos capítulos experimentais pode ser tratado isoladamente sem comprometer o entendimento, já que eles apresentam uma estrutura própria, com introdução, discussão e conclusão.

Embora essa não tenha sido a intenção, “**revisitar**” a modulação do sistema noradrenérgico sobre as memórias pode parecer uma forma de “requestrar” resultados e conclusões. Contudo, a proposta de “revisitar” foi, na verdade, uma maneira de rebuscar a importância dessa via de transmissão clássica – que pode ser considerada um tema já esgotado ou desgastado – no processamento das memórias de medo, considerando novos pontos de vista, perspectivas e implicações do sistema noradrenérgico no estudo das memórias.

1

O processamento dinâmico das memórias

“A memória é o que resta de algo que acontece e não deixa de acontecer completamente.”

— **Edward de Bono**

Muito da identidade individual é construída com base no que se vive e aprende ao longo do tempo, uma vez que as memórias podem modelar comportamentos por meio da criação e retenção de representações internas de experiências passadas. Como recordamos diversos eventos de nossas vidas de maneira vívida, pode-se supor que existam mecanismos específicos capazes de sinalizar e determinar a relevância das informações a serem armazenadas em detrimento às demais, uma característica especialmente evidente no caso das memórias de conteúdo emocional. Para compreender os possíveis motivos por trás disso, é necessário entender o processo dinâmico de formação dessas memórias e sua manutenção ao longo do tempo.

1.1 A formação das memórias: a teoria clássica da consolidação

O aprendizado, por si só, consiste no processo em que o sujeito é confrontado com um evento qualquer, permitindo que uma informação relacionada seja adquirida, na etapa de **aquisição da memória** (DUDAI, 2002). Embora uma versão temporária dessa memória – a **memória de curta duração** – já esteja imediatamente disponível (IZQUIERDO *et al.*, 1999), etapas determinantes para o estabelecimento de uma forma duradoura e “definitiva” dessa memória – a **memória de longa duração** – acontecem no período que segue à aquisição (para revisão, ver DUDAI, 2004). Para tanto, circuitos específicos de neurônios ativados durante a formação da memória sofrem modificações e alterações plásticas que sustentam, ao longo do tempo, o armazenamento dessas informações. Essas modificações requerem o envolvimento complexo e temporalmente orquestrado de estruturas cerebrais, sistemas transmissores e eventos bioquímicos celulares (MCINTYRE, MCGAUGH, WILLIAMS, 2012; JAROME, THOMAS, LUBIN, 2014). Como consequência, as memórias não são formadas instantaneamente, mas estabilizadas gradualmente ao longo do tempo, até que representações duradouras sejam geradas (DUDAI, 2004).

Há muito tempo já se observavam evidências clínicas de traumas cerebrais associados à perda de memórias adquiridas minutos, horas ou até dias antes do acidente, sugerindo a existência de um processamento gradual da memória (RIBOT, 1882). Contudo, essa etapa gradual só foi empiricamente demonstrada em 1900 pelos alemães Georg Müller e Alfons Pilzecker, após a observação, em humanos, de um período pós-aquisição – uma **‘janela temporal’** – em que as memórias eram sensíveis a interferentes. Para denominar essa etapa gradual de

estabilização da memória foi cunhado o termo **consolidação** (do latim ‘*consolidare*’, tornar concreto). A memória é, então, armazenada como uma representação neural específica (o chamado “traço de memória” ou **engrama**), que pode ser utilizada posteriormente. Por fim, o acesso à memória acontece por meio da **evocação** (DUDAI, 2002), momento em que a informação armazenada é lembrada (**Fig. 1**).



Figura 1. Etapas de formação das memórias de longa duração. Após a aquisição, a memória se encontra lábil e sensível a interferentes, sendo necessária a sua consolidação para estabilizar o traço de memória e permitir a sua evocação posterior.

As bases neuroquímicas da consolidação foram elucidadas nos anos seguintes com o uso de antagonistas de receptores específicos ou inibidores da transcrição de RNA e da síntese proteica (FLEXNER, FLEXNER, ROBERTS, 1967; PALFAI, CORNELL, 1968). Contudo, a sensibilidade dessa memória nova a interferentes – sejam eles comportamentais ou farmacológicos – só é evidente dentro de um período limitado de algumas horas após a sua aquisição (IZQUIERDO *et al.*, 1999). Por conta disso, a consolidação pode ser funcionalmente caracterizada e temporalmente delimitada pelo período de tempo, após a aquisição, em que o traço de memória permanece sensível (ou **lábil**) a interferentes (DUDAI, 2004). A consolidação pode sofrer modulação endógena (hormônios do estresse, estado de alerta) ou externa (traumas, agentes farmacológicos, etc.), com impacto direto no traço de memória em formação (MCGAUGH, 1983; 2000). Após esse período, a memória se tornaria resistente (ou “imune”) a interferências, garantindo o estabelecimento da sua forma de longa duração. Mesmo que a consolidação já tenha sido descrita empiricamente há mais de 110 anos, a descoberta de vias de transmissão e etapas bioquímicas recrutadas durante esse processo aconteceu lentamente nos anos seguintes (MCGAUGH, 2000). O esclarecimento dos mecanismos fisiológicos da consolidação da memória progrediu mais recentemente, e de maneira

impressionante, em decorrência do estudo das suas bases celulares e moleculares.

1.2 A plasticidade neuronal na formação das memórias

Em 1949, quando ainda se sabia pouco sobre a consolidação das memórias, o neurocientista canadense Donald Hebb propôs que poderiam existir mecanismos de modificações sinápticas que sustentariam a sua formação. A sua teoria era de que sinapses ativadas de maneira significativa poderiam ser remodeladas, de forma que a sua ativação geraria respostas de maior magnitude nos neurônios pós-sinápticos, um evento que poderia justificar a retenção das memórias (HEBB, 1949). Foi só mais de 20 anos depois que um processo de plasticidade neuronal persistente foi descrito (BLISS, LØMO, 1973), demonstrando que a estimulação elétrica de alta frequência em fatias do cérebro de coelho induzia aumentos sustentados na eficiência sináptica (*i.e.*, um aumento na resposta sináptica frente a um estímulo), processo denominado **potencialização de longa duração** (LTP, do inglês ‘*long-term potentiation*’).

A LTP foi estudada e caracterizada desde então e, por conta de processos celulares e moleculares análogos à consolidação, foi proposta como o substrato fisiológico para a formação das memórias algum tempo mais tarde (BLISS, COLLINGRIDGE, 1993). Após a estimulação intensa de sinapses específicas frente a informações relevantes, a ativação de receptores glutamatérgicos NMDA induz a LTP (HARRIS, GANONG, COTMAN, 1984; para revisão, ver VOLIANSKIS, 2015). O influxo de cálcio resultante leva ao recrutamento de vias intracelulares que induzem a síntese de fatores de transcrição e de novas proteínas responsáveis pelo remodelamento sináptico, como componentes estruturais e receptores de membrana (ABRAHAM, WILLIAMS, 2008; BRAMHAM *et al.*, 2008). O aumento da superfície sináptica e da densidade de receptores sustenta a potencialização duradoura na eficiência sináptica que caracteriza a LTP, além das alterações pré-sinápticas relacionadas com o aumento na liberação de glutamato frente à estimulação (LYNCH, REX, GALL, 2007). Esse processo plástico envolve etapas múltiplas ordenadas sequencial e temporalmente, sendo necessárias algumas horas até que sejam completadas, de maneira análoga à janela temporal da consolidação (DUDAI, 2004). Adicionalmente, o recrutamento de receptores específicos e das vias intracelulares necessárias para a indução desses processos plásticos parecem ser comuns ao processo de

consolidação e de LTP, reforçando a ideia de que ambos poderiam refletir faces distintas de um mesmo evento (BLISS, COLLINGRIDGE, 1993). Embora ainda exista alguma controvérsia sobre a LTP como o mecanismo fisiológico que sustentaria as memórias ao longo do tempo, estudos têm demonstrado, *in vivo*, uma relação direta entre a ocorrência do aprendizado e indução de LTP, bem como à reversão da LTP e consequente perda da memória relacionada (WHITLOCK *et al.*, 2006).

1.3 Retomando o que foi memorizado: o caso da reconsolidação

Com o surgimento da teoria clássica da consolidação e esclarecimento da sua dinâmica de estabilização, passou a se assumir, por muito tempo, que as memórias seriam pouco mutáveis após o término dessa etapa (DUDAI, 2004). Quando vários grupos de pesquisa passaram a reportar resultados discrepantes em memórias previamente consolidadas, essa teoria começou a ser avaliada por um ponto de vista alternativo. Nesses estudos, interferências capazes de prejudicar a consolidação de uma memória também se mostravam efetivos quando aplicados imediatamente após a sua evocação (MISANIN, MILLER, LEWIS, 1968; SCHNEIDER, SHERMAN, 1968; DEVIETTI, KIRKPATRICK, 1976; MACTUTUS, RICCIO, FERREK, 1979). Por conta disso, surgiu a ideia de que a evocação de uma memória formada previamente – ou seja, inativa – seria capaz de torná-la novamente ativa, processo que recebeu o nome de **reativação da memória**. Supostamente, essa memória seria novamente estabilizada e mantida em um estado inativo até um novo evento de evocação/reativação (LEWIS, 1979). Embora esses estudos tenham iniciado uma quebra de paradigmas, eles não causaram muito mais que curiosidade na época, talvez por conta da visão vigente sobre a teoria da consolidação e a busca por dissecar as etapas envolvidas nesse processo.

Em 1997, foi demonstrado que o antagonismo de receptores glutamatérgicos NMDA após a evocação de uma memória aversiva causava um prejuízo na sua retenção (PRZYBYSLAWSKI, SARA, 1997). O envolvimento de receptores β -adrenérgicos também foi descrito nesse processo, bem como a sua natureza gradual, que parecia cada vez mais semelhante à consolidação (PRZYBYSLAWSKI, ROULLET, SARA, 1999). Por conta disso, o termo **reconsolidação** foi ganhando força para caracterizar essa nova fase gradual de estabilização das memórias. A reconsolidação só ganhou destaque após um estudo que evidenciou a possibilidade de “apagar” uma memória de medo por meio da inibição da síntese proteica em estruturas encefálicas

relacionadas com o seu processamento (NADER, SCHAPE, LEDOUX, 2000a). Desde então, as etapas neuroquímicas e moleculares da reconsolidação vem sendo elucidadas e descritas por diversos grupos de pesquisa (para revisão, ver BESNARD, CABOCHE, LAROCHE, 2012).

Uma série de etapas precede e determina se uma memória evocada vai sofrer reconsolidação (**Fig. 2**). Inicialmente, frente à evocação, a rede neural que sustenta a memória é reativada, permitindo a sua expressão (LEE, FLAVELL, 2014). A reativação desse traço de memória pode induzir a sua **desestabilização**, desencadeada pelo tráfego de receptores glutamatérgicos AMPA (HONG *et al.*, 2013), além da ativação de receptores glutamatérgicos NMDA contendo a subunidade NR2B (MILTON *et al.*, 2013), receptores canabinoides CB₁ e canais de cálcio do tipo L (SUZUKI *et al.*, 2008), levando à degradação de proteínas relacionadas à manutenção dessa memória (KAANG, CHOI, 2011). Nesse momento, o traço de memória lábil requer uma nova onda de síntese proteica durante a etapa de reconsolidação, para que seja novamente estabilizado e armazenado (NADER, SCHAPE, LEDOUX, 2000a). A reconsolidação pode acontecer sucessivamente e indefinidamente (DUDAI, 2012), embora ela aconteça menos frequentemente em memórias mais remotas ou de maior intensidade, talvez porque, nesses casos, elas sejam menos susceptíveis à labilização (BUSTOS, MALDONADO, MOLINA, 2009; BUSTOS *et al.*, 2010).



Figura 2. A reconsolidação como uma nova etapa de estabilização das memórias. Frente à evocação da memória, ela é reativada e pode ser desestabilizada, sendo necessária a etapa de reconsolidação para mantê-la em sua forma estável.

A existência de uma nova etapa de estabilização que mantém a memória vulnerável após a sua evocação pode parecer sem sentido. Contudo, a reconsolidação apresenta algumas funções biológicas que fazem dela um componente essencial no processamento dinâmico das

memórias (DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2013; para revisão, ver DUDAI, 2006; ALBERINI, 2011). A primeira delas é permitir a modulação neuroendócrina, desencadeada com a lembrança, sobre a memória original, levando ao seu **fortalecimento** em situações em que ela permanece relevante, o que garante a sua manutenção ao longo do tempo (FUKUSHIMA *et al.*, 2014). A lembrança recorrente e a reconsolidação também são capazes de manter a **precisão** das memórias, reduzindo a possibilidade de perda de detalhes específicos com o passar do tempo (DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2011). Além disso, frente a pequenas mudanças, é possível incorporar novas informações à memória original – a **atualização** – por mecanismos dependentes da reconsolidação (LEE, 2009; 2010). Por fim, embora não seja uma função biológica/fisiológica propriamente dita, a reconsolidação oferece uma oportunidade para a realização de interferências sobre as memórias, possibilidade que vem ganhando destaque como alternativa para o controle de memórias disfuncionais que podem originar transtornos psiquiátricos (SCHILLER *et al.*, 2010; SOETER, KINDT, 2011; PITMAN, 2011; MILTON, 2013; SCHWABE, NADER, PRUESSNER, 2014). Todos esses motivos fizeram da reconsolidação um alvo frequente de estudos, e a aceitação dessa etapa como integral no processamento das memórias forçou uma mudança de pensamento, aceitando que a memória poderia ser mais maleável e dinâmica do que inicialmente proposto (MILLER, MATZEL, 2000; NADER, SCHAFE, LEDOUX, 2000b; DUDAI, EISENBERG, 2004).

O termo adotado, reconsolidação, remete muito à ideia de que essa etapa seria uma repetição da consolidação, uma simples reprise do mesmo processo. Embora algumas das características da consolidação sejam compartilhadas, como a dependência de certas vias intracelulares (DUVARCI, NADER, LEDOUX, 2008; MAC CALLUM *et al.*, 2014), sabe-se que vários mecanismos parecem ser divergentes (BESNARD, CABOCHE, LAROCHE, 2012). Para uma mesma memória, já foi descrito o envolvimento diferencial de estruturas cerebrais (TRONEL, SARA, 2002; ALBERINI, 2005; TRONSON, TAYLOR, 2007; MAMIYA *et al.*, 2009) e de vias de neurotransmissão (DEBIEC, LEDOUX, 2004; BUCHERELLI *et al.*, 2006), além de divergências celulares e moleculares, como o das regiões neuronais que seriam alvos para alterações plásticas (*e.g.*, pré- ou pós-sinápticas; LI *et al.*, 2013a) e a síntese de fatores de transcrição e outros genes de expressão imediata relacionados ao processamento das memórias (VON HERTZEN, GIESE, 2005; LEE, EVERITT, THOMAS, 2004; LEE, HYND, 2013). Em conjunto, esses dados sustentam a ideia de que, mesmo que

parecidas em alguns aspectos, ambas as etapas de estabilização são independentes e distintas.

1.4 O estudo empírico das memórias: o condicionamento clássico pavloviano

O russo Ivan Pavlov é considerado o pai do estudo das memórias associativas, embora ele se referisse ao seu trabalho como um estudo dos “reflexos condicionados”, que seriam nada mais que a expressão comportamental da memória associativa (PAVLOV, 1927). Nos seus ensaios, Pavlov se baseou em duas premissas: um **estímulo incondicionado** (‘US’, do inglês ‘*unconditioned stimulus*’) seria aquele naturalmente capaz de induzir uma resposta comportamental específica (resposta incondicionada), seja essa resposta positiva (frente a estímulos apetitivos, por exemplo) ou negativa (frente a estímulos aversivos), ao passo que um estímulo neutro seria incapaz de causar, por si só, qualquer resposta no indivíduo avaliado.

No seu experimento com cães, Pavlov demonstrou que a apresentação de estímulos incondicionados associados a estímulos neutros levavam à formação de uma memória. Frente a diversos eventos de associação entre esses dois estímulos (**pareamento**), a memória seria estabelecida até um ponto onde a simples apresentação do estímulo neutro seria capaz de induzir respostas comportamentais idênticas às aquelas causadas pelo estímulo incondicionado. Nesse momento, o estímulo neutro passa a ser denominado **estímulo condicionado** (‘CS’, do inglês ‘*conditioned stimulus*’), já que a memória associativa permite a evocação de respostas condicionadas – idênticas às respostas incondicionadas originais – frente a esse estímulo, originalmente sem qualquer valência (PAVLOV, 1927). Mesmo que o estudo mais famoso de Pavlov tenha utilizado US apetitivos, o mesmo protocolo pode ser adaptado para o estudo das memórias de caráter negativo, com o uso de estímulos aversivos.

O entendimento atual sobre as etapas de processamento das memórias se deve, em grande parte, ao legado de Pavlov. O fato de que muitas das memórias corriqueiras são baseadas no aprendizado associativo (AGUADO, 2003), juntamente à fácil transposição do protocolo de condicionamento clássico pavloviano para animais de laboratório (KRYUKOV, 2012) e até mesmo humanos (DELGADO, OLSSON, PHELPS, 2006), fez com que esse tipo de protocolo comportamental ganhasse destaque. Entre eles, o condicionamento de medo é um dos mais utilizados no estudo das memórias, oferecendo

uma base concreta para o entendimento das memórias emocionais de caráter negativo (MAREN, PHAN, LIBERZON, 2013; BRISCIONE, JOVANOVIC, NORRHOLM, 2014). A adaptação desses protocolos é uma simples transposição dos experimentos de Pavlov para as condições pré-clínicas, em roedores: como estímulo incondicionado para o estudo das memórias aversivas, geralmente se utilizam choques elétricos aplicados nas patas, embora outros, menos comumente, também possam ser adotados (BLANCHARD *et al.*, 2001; GUITTON, DUDAI, 2004; CAVALLI, BERTOGLIO, CAROBREZ, 2009; PAVESI, CANTERAS, CAROBREZ, 2011). O estímulo neutro também pode ser de várias modalidades, embora os condicionamentos ao som e ao contexto sejam os mais utilizados. Como o estímulo incondicionado e neutro podem ser processados por vias sensoriais específicas, podendo haver o envolvimento de estruturas encefálicas diferentes, a escolha de cada uma das características adotadas no procedimento experimental é crítica (LEDOUX, 2000).

As fases de formação da memória são facilmente relacionadas às etapas utilizadas nos protocolos de condicionamento (BOUTON, MOODY, 2004). Tomando como exemplo o condicionamento de medo contextual, é possível traçar um paralelo. Inicialmente, os roedores são expostos a uma caixa de choques por um curto período de tempo, em uma sessão de familiarização, para que ele possa conhecer esse ambiente e formar uma representação espacial relacionada (“contextualizar”; **Fig. 3A**), um processo necessário para a formação de memórias contextuais (FANSELOW, 2000). A sessão de treino consiste no pareamento entre o(s) choque(s) elétrico(s) aplicado(s) nas patas com o contexto (a caixa de choque), que é o estímulo neutro até então. Nesse momento, ocorre a associação entre os dois estímulos e aquisição da memória de medo. Nas horas seguintes, a memória adquirida permanece lábil, sendo engatilhada a consolidação da memória (**Fig. 3B**).

Embora a “busca pelo engrama” seja constante, não existem ainda outras medidas, além das comportamentais, para garantir que uma memória tenha mesmo sido formada. Na maioria das vezes, a evocação é a única maneira de comprovar a sua existência. Para tanto, é necessário re-expor os animais ao contexto previamente pareado com os choques e verificar a ocorrência de comportamentos relacionados ao medo. Animais previamente condicionados apresentam reações de medo frente ao contexto pareado (estímulo condicionado), agora com valência negativa. Quando esses animais são re-expostos a esse contexto, as informações espaciais são recuperadas e a memória associativa que liga esse ambiente ao estímulo aversivo prévio é evocada (**Fig. 4A**),

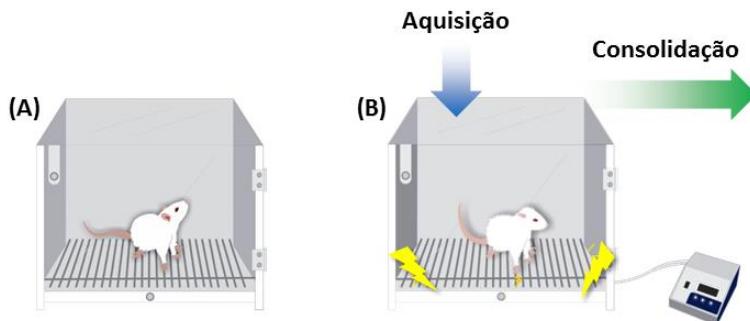


Figura 3. (A) Familiarização ao contexto e (B) associação com o estímulo incondicionado. Com a associação entre os choques elétricos e o contexto, a memória aversiva é adquirida e consolidada nas horas seguintes.

permitindo a execução de comportamentos de medo – a **expressão da memória** – apropriados àquela situação (LEDOUX, 2000). O comportamento de congelamento (*'freezing'*), definido como a ausência total de movimentos do corpo e cabeça, exceto àqueles necessários para a respiração, é comumente utilizado como medida de medo em ratos (FANSELOW, 1980), servindo como um índice de formação da memória de medo. Ainda é possível testar a especificidade da memória associativa ao expor os animais a um ambiente diferente daquele onde os choques foram aplicados. É natural que uma memória específica só leve à expressão de medo frente ao contexto previamente associado aos choques, mas não a um contexto novo e neutro (**Fig. 4B**).

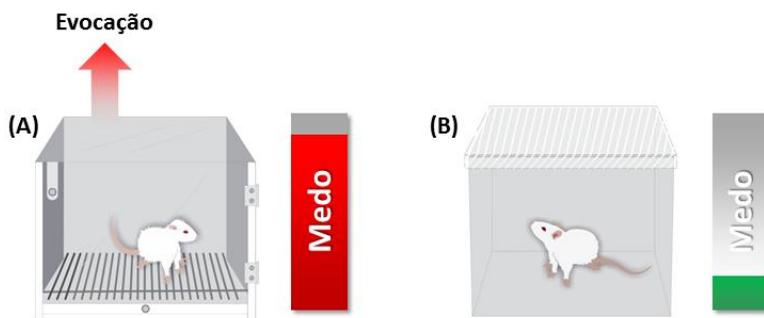


Figura 4. Evocação e verificação da especificidade das memórias de medo. (A) Ao retornar ao contexto previamente pareado com os choques, a memória aversiva é evocada, levando à expressão de comportamentos de medo. (B) Em um contexto neutro, essa memória não é evocada, resultando em níveis baixos de medo.

Quando os animais são re-expostos ao contexto pareado por pouco tempo, a memória é evocada e o animal expressa reações de medo na expectativa de receber um choque (embora este não seja aplicado durante essa sessão). Durante essa exposição curta, a memória de medo pode ser reativada e labilizada, passando, então, pela etapa de reconsolidação para ser mantida (MERLO *et al.*, 2014) (**Fig. 5A**). A exposição mais prolongada a esse contexto permite que a memória sofra extinção: nesse caso, a expectativa de receber um novo choque não é correspondida com o passar do tempo (*i.e.*, a associação do contexto com o choque se torna obsoleta), havendo a formação da memória de extinção no intuito de suprimir a memória associativa que levava à expressão do medo (MERLO *et al.*, 2014) (**Fig. 5B**). Portanto, a duração da exposição ao contexto pareado é uma das condições limitantes para determinar a ocorrência da reconsolidação ou extinção. De maneira interessante, embora ambos sejam desencadeados frente à evocação, o resultado comportamental esperado é justamente o oposto: a reconsolidação leva à manutenção da memória original e expressão de comportamentos de medo, enquanto a extinção causa uma supressão dessa memória e atenuação nas respostas defensivas frente ao contexto pareado (EISENHARDT, MENZEL, 2007).

O condicionamento de medo contextual recruta estruturas encefálicas para a formação da memória associativa, como o córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo (PARÉ, 2002; KIM, JUNG, 2006). O hipocampo recebe grande destaque nesse caso, já que a memória contextual depende fortemente da integridade hipocampal para ser adquirida, consolidada, evocada, reconsolidada e até mesmo extinta (FANSELOW, 2000). Por conta disso, não é incomum se referir a esse condicionamento como hipocampo-dependente. Muitas estruturas encefálicas envolvidas no condicionamento contextual em roedores são também regiões de interesse em humanos, já que alguns transtornos psiquiátricos que se relacionam com a formação exagerada de memórias de medo parecem ser ligados à atividade disfuncional de regiões cerebrais homólogas (MAREN, PHAN, LIBERZON, 2013). Várias vias de transmissão modulam o processamento das memórias de medo contextual em roedores, sendo de destaque a participação dos sistemas noradrenérgico e glicocorticoide, classicamente implicados nesse caso (ROOZENDAAL, BARSEGYAN, LEE, 2008), além do sistema endocanabinoide, que mais recentemente vem sendo associado às memórias emocionais (NEUMEISTER *et al.*, 2015). A função desses moduladores é constantemente estudada, mas, mesmo no caso dos sistemas mais clássicos, o conhecimento sobre os seus mecanismos de

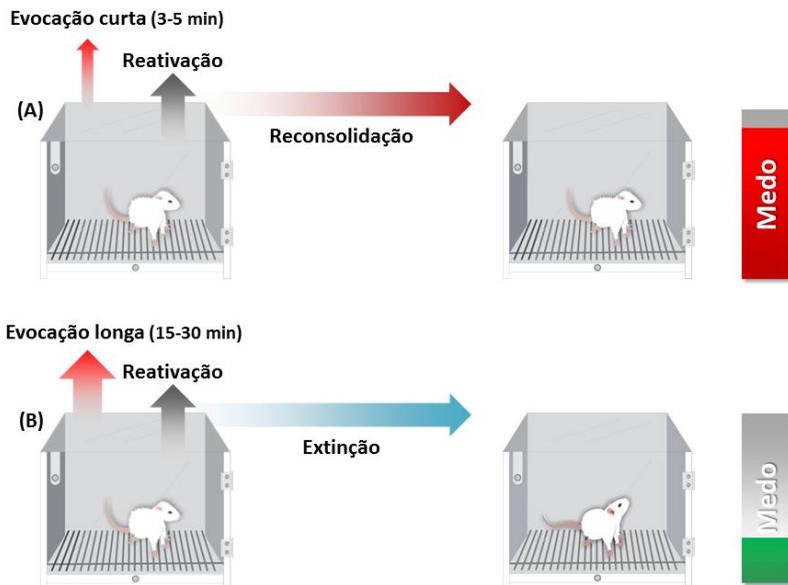


Figura 5. Indução da reconsolidação ou extinção da memória de medo contextual. (A) Exposições curtas ao contexto pareado permitem a reativação do traço de memória e subsequente reconsolidação para estabilizar e manter a memória de medo. (B) Exposições mais longas, no entanto, levam à extinção, com atenuação do medo.

modulação sobre a memória está longe de se completar. O aprofundamento desse conhecimento se faz necessário não somente para esclarecer aspectos fisiológicos, mas também quanto às possíveis implicações dos mesmos na patogênese de transtornos psiquiátricos (JOHANSEN *et al.*, 2011; KWAPIS, WOOD, 2014). Por conta disso, o condicionamento de medo é bastante utilizado não apenas para estudo das bases fisiológicas do processamento das memórias aversivas, mas também como uma possível ferramenta translacional para o entendimento das bases neurobiológicas de distúrbios emocionais e cognitivos (MILLER, MCEWEN, 2006; LUYTEN *et al.*, 2011; VAN ELZAKKER *et al.*, 2014). Vale lembrar que um modelo animal muito dificilmente vai reproduzir as condições clínicas humanas, mas extrapolações nesse sentido são frequentes e, algumas vezes, um pouco exageradas.

2

A modulação noradrenérgica das memórias de medo: uma questão de intensidade

“Nada fixa alguma coisa tão intensamente na memória quanto o desejo de esquecer.”

— Michel de Montaigne

2.1 INTRODUÇÃO

As memórias emocionais talvez permitam as lembranças mais persistentes e vívidas dentre todo o conjunto de lembranças armazenadas por nós. As razões adaptativas para isso são bastante claras, especialmente quando se considera o caso das memórias de caráter negativo, que armazenam informações potencialmente relevantes para o confronto com situações de perigo, oferecendo um repertório de comportamentos adequados a serem realizados frente a situações idênticas ou similares que voltem a acontecer (para revisão, ver DUDAI, 2009). Por esse motivo, a formação das memórias de medo recruta o envolvimento de um circuito encefálico complexo, que prioriza a sua formação. Esse circuito é responsável pela “cor” dada às mesmas, atribuída à grande interação de estruturas límbicas e a ação modulatória hormonal, que culminam na maior eficiência da estabilização desses traços, de maneira mais rica e resistente (CAHILL, MCGAUGH, 1996). Além do hipocampo, que é o responsável majoritário pela codificação e consolidação dessas memórias (O'KEEFE, NADEL, 1978; IZQUIERDO, MEDINA, 1997; KNOWLTON, FANSELOW, 1998; FANSELOW, 2000), a amígdala ganha muito destaque por responder prontamente a situações de estresse, potencializando a formação da memória diretamente, por meio da conectividade com demais estruturas encefálicas, ou indiretamente, por induzir a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e a liberação de glicocorticoides e adrenalina (PAZ, PARÉ, 2013). O córtex pré-frontal tem um papel modulatório sobre grande parte das estruturas recrutadas na formação dessas memórias, exercendo uma função mais refinada de controle (GILMARTIN, BALDERSTON, HELMSTETTER, 2014), além da sua implicação direta no processamento e armazenamento das memórias (EINARSSON, NADER, 2012).

Como consequência da interposição de substratos neurais responsáveis pelos processos de formação de memória e respostas frente a situações de estresse (RODRIGUES, LEDOUX, SAPOLSKY, 2009), as memórias de medo são frequentemente experimentadas com alto grau de detalhamento, pouco comuns às memórias neutras (REISBERG, HEUER, 2004). Contudo, quase tão impróprio como não formar memórias emocionais potencialmente úteis seria o contrário, como a formação de memórias aversivas exageradas – que também são referidas como **memórias aberrantes, inapropriadas, disfuncionais, traumáticas** ou **patológicas** – em condições extremas. Ao contrário das

memórias de medo “normais” (também denominadas **fisiológicas** ou **adaptativas**), as memórias inapropriadas trazem consequências prejudiciais, até mesmo constituindo o cerne de alguns transtornos psiquiátricos, com a expressão exacerbada de respostas de ansiedade e medo a níveis patológicos (YEHUDA, JOËLS, MORRIS, 2010). No entanto, os critérios para a classificação de uma memória como “normal” ou “inapropriada” são subjetivos, havendo uma distinção muito mais didática que funcional. Além disso, como o estudo empírico da memória se faz por meio de modelos animais para a indução de memórias aversivas, é muito mais comum se restringir ao estudo das memórias normais em condições pré-clínicas, somente havendo o aprofundamento de memórias de caráter inapropriado em pacientes psiquiátricos (PITMAN *et al.*, 2012). Para que essa distinção se torne mais clara, ainda é necessário um entendimento aprofundado das fronteiras entre ambos os processos, bem como a determinação das vias de transmissão e mecanismos responsáveis pela transição entre as duas situações. Mesmo assim, estima-se que a principal razão para a formação das memórias inapropriadas sejam disfunções em substratos neurais e vias de transmissão responsáveis pela modulação das memórias emocionais (ELZINGA, BREMNER, 2002).

O sistema noradrenérgico é comumente associado às memórias de medo (KOBAYASHI, YASOSHIMA, 2001; VAN STEGEREN, 2008). Além da sua função modulatória sobre memórias aversivas de caráter adaptativo, que vem sendo explorada em condições pré-clínicas há muito tempo (RANDT *et al.*, 1971; KNYAZEV, NIKIFOROV, 1976; MCCARTY, GOLD, 1981), cada vez mais evidências indicam a participação dessa via na formação de memórias traumáticas e transtornos psiquiátricos (SOUTHWICK *et al.*, 1999; O'DONNELL, HEGADOREN, COUPLAND, 2004; STRAWN, GERACIOTI, 2008), tornando o sistema noradrenérgico um forte candidato a direcionar as memórias de medo para formas inapropriadas.

2.1.1 A modulação noradrenérgica sobre as memórias emocionais

A participação dessa via de transmissão na formação de memórias foi proposta nos anos 70, quando o pesquisador Seymour Kety sugeriu que a ativação noradrenérgica em algumas estruturas cerebrais poderia aumentar a frequência de disparos em neurônios ativados seletivamente durante eventos relevantes, especialmente aqueles carregados de valência emocional. Kety sugeriu ainda que a noradrenalina não só exerceria esse efeito agudo, mas poderia agir

induzindo uma “facilitação persistente” nesses terminais sinápticos, potencializando a formação da memória (KETY, 1972). Posteriormente, estudos comprovaram modulação noradrenérgica no fortalecimento da LTP (HARLEY, 1987; 1991), achados que reforçaram a então chamada “hipótese de Kety” para modulação noradrenérgica da memória.

O sistema noradrenérgico permite a modulação complexa de funções emocionais e cognitivas por meio do eixo simpatoadrenomedular/*locus coeruleus* (SAM/LC). Eventos carregados emocionalmente estimulam a medula adrenal (**Fig. 6A**), causando a liberação de adrenalina na corrente sanguínea (DE DIEGO, GANDÍA, GARCÍA, 2008). Embora as catecolaminas sejam incapazes de atravessar a barreira hematoencefálica, a ativação de receptores β -adrenérgicos presentes em aferentes do nervo vago modula a atividade do sistema nervoso central (LIANG *et al.*, 1986; CHEN, WILLIAMS, 2012; SHEN *et al.*, 2012b). A estimulação vagal ativa o núcleo do trato solitário, uma estrutura bulbar com projeções excitatórias para o *locus coeruleus* (LC). Esse último núcleo do tronco cerebral concentra neurônios noradrenérgicos que enviam projeções e fornecem noradrenalina para a maioria das estruturas encefálicas que constituem a circuitaria do processamento de memórias aversivas (SARA, 2009). Uma vez ativado, o LC permite a liberação de noradrenalina em centros autonômicos mesencefálicos, que completam um circuito de retroativação do eixo SAM por modulação periférica da medula adrenal (MCGAUGH, 2000). É importante ressaltar que o recrutamento do eixo SAM/LC não necessariamente obedece a essa sequência de ativação, podendo ser ativado em paralelo: o LC, por exemplo, apresenta atividade constitutiva e também é estimulado diretamente por eventos aversivos (**Fig. 6B**). A modulação periférica promovida pelo SAM, contudo, permite o ajuste e potencialização da sua atividade nessas ocasiões, adaptando o recrutamento adrenérgico de acordo com a situação (SARA, BOURET, 2012). Dessa forma, a importância da experiência, refletida diretamente no perfil de ativação neuro-hormonal, é capaz de moldar a intensidade e o caráter da memória em formação, tornando-as mais intensas, vívidas e persistentes (VAN STEGEREN, 2008; JOËLS, FERNANDEZ, ROOZENDAAL, 2011; MCGAUGH, 2000; DUDAI, 2004).

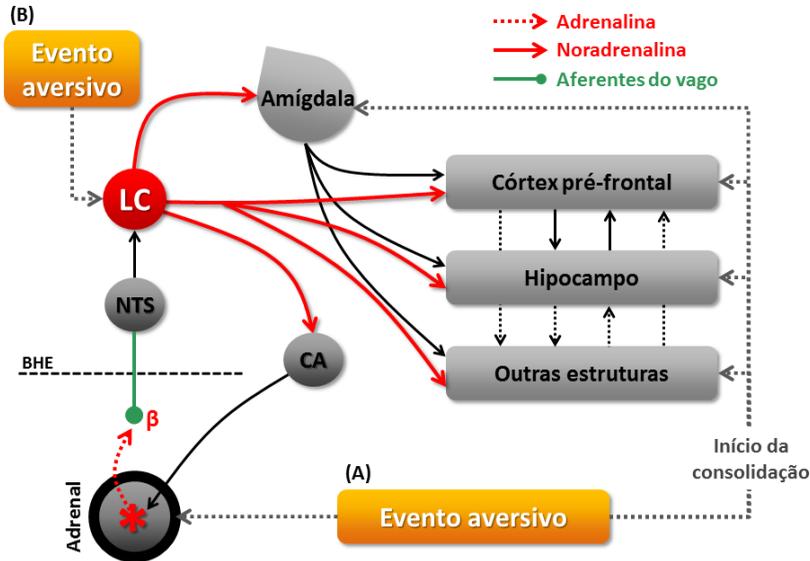


Figura 6. O eixo simpatoadrenomedular/locus coeruleus. Frente a um evento aversivo, há a ativação da (A) medula adrenal por meio de estruturas encefálicas, além do (B) aumento da atividade do locus coeruleus. As setas pretas, contínuas ou pontilhadas, indicam conexões diretas ou indiretas, respectivamente. BHE, Barreira hematoencefálica; β , receptores β -adrenérgicos; NTS, núcleo do trato solitário; LC, locus coeruleus; CA, centros autonômicos. (Adaptado de MCGAUGH, 2000).

2.1.2 Os receptores adrenérgicos no processamento das memórias

Os receptores adrenérgicos são ativados pela adrenalina e noradrenalina, embora o tônus noradrenérgico no sistema nervoso central seja basicamente definido pela última (BYLUND, 2007). Desde que a existência dos receptores adrenérgicos foi sugerida por Raymond Perry Ahlquist (1948), houve uma classificação ao longo dos anos com base em diferenças quanto à afinidade por agonistas e antagonistas, além desses receptores serem produtos de genes distintos (AHLQUIST, 1980). Atualmente, eles são classificados, de maneira geral, em β , α_1 e α_2 (Fig. 7).

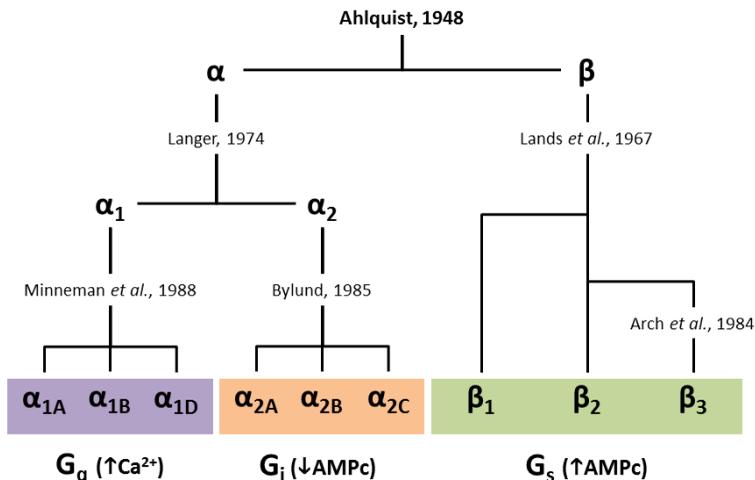


Figura 7. Classificação dos subtipos de receptores adrenérgicos e principais vias de transdução. (Adaptado de BYLUND, 2007).

Classicamente, todos os receptores β -adrenérgicos são acoplados a proteínas G estimulatórias (G_s), aumentando a atividade da adenil ciclase e a concentração de AMPc. Os receptores α_1 -adrenérgicos são acoplados a proteínas G estimulatórias do tipo q (G_q), permitindo a ativação da fosfolipase C e aumento de cálcio intracelular. Já os receptores α_2 -adrenérgicos são mais distintos que os demais: eles se acoplam a proteínas G inibitórias (G_i), reduzindo a atividade da adenil ciclase e a concentração de AMPc, com ação inibitória (BYLUND, 2007). Embora os receptores α_2 -adrenérgicos possam ser expressos em membranas pós-sinápticas, a sua distribuição majoritária é pré-sináptica como autoceptores (*i.e.*, expressão significativa no *locus coeruleus*), com função autorregulatória pronunciada sobre a liberação de noradrenalina no cérebro, havendo redução na síntese e liberação desse transmissor frente à sua ativação (STARKE, 2001).

Todos esses subtipos de receptores adrenérgicos são expressos – mesmo que em densidades diferentes – em áreas cerebrais relacionadas com as memórias (ALEXANDER, DAVIS, LEFKOWITZ, 1975; RAINBOW, BIEGON, 1983; RAINBOW, PARSONS, WOLFE, 1984; MCCUNE, VOIGT, HILL, 1993; NICHOLAS, HÖKFELT, PIERIBONE, 1996). Por isso, além de promover o recrutamento de respostas defensivas imediatas, no intuito de lidar propriamente com eventos aversivos (*i.e.*, as reações clássicas de “luta ou fuga”), a

transmissão adrenérgica também permite a modulação direta sobre as etapas de estabilização da memória. As evidências que demonstram a ação modulatória da noradrenalina sobre a memória, regulando a sua intensidade e persistência, só aumentam com o passar dos anos (GOLD, VAN BUSKIRK, 1975; 1978a; 1978b; MCGAUGH, 1983; 2000).

O papel modulatório da noradrenalina sobre as memórias emocionais é geralmente atribuído à ativação de receptores β -adrenérgicos. A participação deles é extensamente descrita na literatura, seja durante a consolidação (CAHILL *et al.*, 1994; SARA, ROULLET, PRZYBYSLAWSKI, 1999; MCGAUGH, ROOZENDAAL, 2002; VAN STEGEREN, EVERAERD, GOOREN, 2002; JI, WANG, LI, 2003; TRONEL, FEENSTRA, SARA, 2004; MILTON, LEE, EVERITT, 2008; KROON, CAROBREZ, 2009; GUZMÁN-RAMOS *et al.*, 2012; OUYANG *et al.*, 2013), ou reconsolidação (PRZYBYSLAWSKI, ROULLET, SARA, 1999; DEBIEC, BUSH, LEDOUX, 2011; ACHTERBERG, TREZZA, VANDERSCHUREN, 2012; SCHWABE, NADER, PRUESSNER, 2013). Em paralelo aos resultados comportamentais, a ativação desses receptores também potencializa a LTP (GOLD, VAN BUSKIRK, 1975; BRAMHAM, BACHER-SVENDSEN, SARVEY, 1997; MONDACA *et al.*, 2004; KOROL, GOLD, 2008). A modulação noradrenérgica pode ser justificada, nesses casos, pela facilitação da ocorrência das alterações plásticas consequente da estimulação da síntese proteica induzida pela ativação de receptores β -adrenérgicos em estruturas-alvo para o processamento da memória (STRAUBE, FREY, 2003; GELINAS, NGUYEN, 2005).

Contudo, a ação noradrenérgica não se restringe ao recrutamento de receptores β . Os receptores α_1 -adrenérgicos também são amplamente expressos no sistema nervoso central (RAINBOW, BIEGON, 1983; NICHOLAS, HÖKFELT, PIERIBONE, 1996), podendo ser envolvidos no processamento cognitivo e emocional (RASKIND *et al.*, 2000). Esses receptores parecem ter um papel importante nos efeitos neuroendócrinos do estresse (VAN DE KAR, BLAIR, 1999), já que um aumento na sua expressão é observado no hipocampo após situações aversivas (CAMPEAU *et al.*, 2010). No entanto, a participação desses receptores na consolidação/reconsolidação das memórias de medo ainda não foi muito explorada. Embora o envolvimento de receptores α_1 -adrenérgicos na indução da LTP já tenha sido demonstrado (PUSSINEN, SIRVIÖ, 1998), poucos estudos sustentam a sua participação nas etapas de estabilização de memórias espaciais (PUUMALA *et al.*, 1998) ou emocionais (FERRY, ROOZENDAAL, MCGAUGH, 1999; BERNARDI, LATTAL, 2010; LAZZARO *et al.*,

2010). Uma vez que os receptores β - e α_1 -adrenérgicos recrutam vias de sinalização distintas (BYLUND, 2007) e são expressos de maneira heterogênea em estruturas cerebrais relacionadas com a consolidação e reconsolidação (NICHOLAS, HÖKFELT, PIERIBONE, 1996), a participação diferencial desses receptores durante essas fases de estabilização poderia ser esperada. Esta é uma premissa consistente com as evidências atuais apontando diferenças entre essas etapas da memória (DUDAI, EISENBERG, 2004; LEE, EVERITT, THOMAS, 2004; BESNARD, CABOCHE, LAROCHE, 2012). No entanto, nenhum estudo investigou a possibilidade de um recrutamento diferencial de receptores adrenérgicos nessas fases da memória até o momento.

O papel dos receptores α_2 -adrenérgicos na memória é muito menos claro, uma vez que seu efeito é indireto por modular a liberação da noradrenalina. De maneira geral, a ativação desses receptores prejudica o processamento da memória (GOZZANI, IZQUIERDO, 1976; GAMACHE, PITMAN, NADER, 2012), enquanto o seu bloqueio o facilita (HAAPALINNA, SIRVIÖ, LAMMINTAUSTA, 1998; O'CARROLL *et al.*, 1999b; SOETER, KINDT, 2012), no caso da administração sistêmica de drogas que modulem a atividade desses receptores. Frente à interferência específica em estruturas cerebrais, os efeitos são menos claros (GIBBS, SUMMERS, 2003; FERRY *et al.*, 2014), já que eles dependem diretamente da localização preferencial desses receptores na estrutura-alvo (*e.g.*, no córtex pré-frontal parece haver uma alta densidade desses receptores em superfícies pós-sinápticas; FUSTER, 2008). A maior contribuição desses receptores é por representarem um alvo interessante no estudo de particularidades dessa via de transmissão, já que é possível aumentar ou reduzir o tônus noradrenérgico com o uso de ligantes seletivos.

A ioimbina, por exemplo, é um antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos que impede a sua ação inibitória, aumentando os disparos de neurônios do *locus coeruleus* (IVANOV, ASTON-JONES, 1995) e a liberação de noradrenalina em diversas regiões do cérebro (ABERCROMBIE, KELLER, ZIGMOND, 1988; CRESPI, 2009). Mesmo em humanos, a administração dessa droga induz alterações relacionadas à ativação noradrenérgica (O'CARROLL *et al.*, 1999a; SOETER, KINDT, 2012), razão pela qual ela é utilizada, com frequência, para induzir estados de hiperatividade noradrenérgica. Além disso, como a ioimbina é um agente simpatomimético indireto, o neurotransmissor endógeno acaba sendo o responsável final pelos efeitos induzidos. De um ponto de vista fisiológico, esse mecanismo de ação é vantajoso já que o transmissor apresenta um perfil muito

particular de ligação e ativação de receptores adrenérgicos (ZHANG, OUYANG, THOMAS, 2004). Essa condição dificilmente seria alcançada com o uso de agonistas sintéticos, mais potentes e seletivos para subtipos específicos de receptores adrenérgicos, que causariam manipulações mais “artificiais” dificilmente alcançadas fisiologicamente.

2.2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

A hipótese dessa etapa do trabalho é que a potencialização do sistema noradrenérgico levaria à facilitação da consolidação e reconsolidação de uma memória de medo contextual, podendo haver diferenças quanto ao recrutamento de subtipos de receptores adrenérgicos nessas duas situações, tanto para a formação de memórias de medo adaptativas quanto inapropriadas.

2.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral foi avaliar o efeito da ioimbina sobre as fases de estabilização da memória de medo contextual, definindo o papel de receptores α_1 - e β -adrenérgicos nas memórias de medo normais e inapropriadas.

2.2.1.1 *Objetivos específicos*

- Caracterizar o efeito da ioimbina sobre a consolidação e reconsolidação da memória de medo contextual;
- Avaliar o efeito do agonista de receptores α_2 -adrenérgicos, clonidina, sobre a consolidação e reconsolidação da memória de medo contextual;
- Investigar o possível recrutamento diferencial de receptores α_1 - e β -adrenérgicos para a facilitação da consolidação e reconsolidação da memória de medo contextual adaptativa;
- Avaliar a capacidade de interferências sequenciais sobre as etapas de estabilização da memória de medo contextual em gerar memórias inapropriadas e determinar requisitos para indução da generalização do medo;
- Investigar o possível recrutamento diferencial de receptores α_1 - e β -adrenérgicos para a indução da generalização do medo.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Animais

Foram utilizados 586 ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, com 3 a 4 meses de idade e peso entre 270 e 350 g. Durante o período de permanência no biotério, eles foram alojados em gaiolas plásticas padrão (36 x 30 x 15 cm), contendo até cinco ratos cada. Os animais tiveram acesso a água e comida *ad libitum* e a temperatura ambiente foi mantida em 22 ± 1 °C, com ciclo de luz claro/escuro de 12 h (início às 07:00 h). O trabalho foi realizado mediante aprovação do comitê de ética para o uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (17/CEUA/PRPE/2011-PP660).

2.3.2 Drogas

Cloridrato de ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg; Tocris, EUA), bitartarato de adrenalina (ADR; 0,1 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA), cloridrato de clonidina (CLO; 0,1 ou 0,3 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA), cloridrato de propranolol (PROP; 10 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA), nadolol (NAD; 10 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA) e cloridrato de prazosin (PRAZ; 0,5 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA) foram dissolvidos em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) e administrados sistemicamente (i.p.) no volume de 1,0 ml/kg. Quando mais de um tratamento foi realizado sistemicamente, a administração das drogas foi realizada em um intervalo de tempo de 10 min a fim de minimizar a possibilidade de interações químicas ou farmacocinéticas entre elas.

A dose de ioimbina foi selecionada com base em experimentos preliminares, onde doses entre 0,5 e 2,5 mg/kg foram triadas, e também com base em trabalhos que demonstraram o papel facilitatório dessa droga na extinção da memória (MORRIS, BOUTON, 2007) e indução da LTP *in vivo* (MONDACA *et al.*, 2004). A dose de adrenalina utilizada foi triada na faixa de 0,01 a 1,0 mg/kg, com base em estudos que demonstram seu efeito em potencializar a consolidação da memória de medo (GOLD, VAN BUSKIRK, 1975). As doses de prazosin, propranolol e nadolol foram selecionadas com base em experimentos prévios e estudos que evidenciaram a capacidade dessas drogas em prevenir o efeito comportamental e cardiovascular de agonistas seletivos de receptores α_1 - e β -adrenérgicos (DO-MONTE, ALLENSWORTH, CAROBREZ, 2010; DO-MONTE *et al.*, 2010). A faixa de doses de clonidina foi selecionada com base em estudos que demonstraram o seu

feito em reduzir a liberação de noradrenalina no cérebro (ABERCROMBIE, KELLER, ZIGMOND, 1988) e prejudicar a LTP *in vivo* (MONDACA *et al.*, 2004).

2.3.3 Condicionamento de medo contextual

O condicionamento de medo contextual foi realizado em uma caixa retangular (35 x 20 x 30 cm), com paredes laterais de alumínio e uma parede frontal e teto com abertura feitos de acrílico, designado doravante de Contexto A. O piso gradeado, feito de barras de aço inoxidável (3 mm de diâmetro, espaçadas 9 mm cada), é conectado a um gerador de choques elétricos (Insight, Ribeirão Preto, Brasil), permitindo a aplicação de choques elétricos nas patas dos animais. Uma segunda caixa (30 x 30 x 30 cm), designada Contexto B, feita de vidro e com uma tampa gradeada e completamente transparente, foi utilizada para verificar a ocorrência de generalização do medo em um contexto neutro, já que esse ambiente apresenta pistas contextuais tão diferentes quanto possível quando comparado ao Contexto A.

Os experimentos comportamentais foram realizados com luminosidade de 70 lux e ocorreram entre às 13:00 e 17:00 h. Cada animal foi colocado no Contexto A, sendo permitida a exploração livre (3 min), durante uma sessão inicial de familiarização. No dia seguinte, o rato foi colocado novamente no Contexto A para a sessão de treino (ou pareamento), durante a qual ele recebeu, após 30 s iniciais (período pré-choque), **um choque elétrico nas patas** (0,7 mA, 60 Hz, por 3 s), no denominado **treino fraco**. O animal permaneceu na caixa por 30 s adicionais (período pós-choque) antes de retornar à caixa-moradia. Em algumas situações, os animais receberam, durante a sessão de condicionamento, não um, mas **três choques elétricos nas patas** (de mesma intensidade, com intervalo de 30 s entre cada choque), no denominado **treino forte**. Os protocolos de treino foram adotados com base em estudos piloto.

Um dia após a sessão de treino, os animais foram re-expostos ao Contexto A (3 min), sem a apresentação de choques, para a evocação e avaliação da retenção da memória (Teste A). Um dia depois, os animais foram expostos ao Contexto B (3 min), a fim de avaliar a especificidade do protocolo de condicionamento utilizado frente a um contexto neutro (Teste B). Para avaliar a consolidação da memória, interferências foram realizadas após a sessão de treino. Quando o objetivo era avaliar a etapa de reconsolidação, uma sessão de reativação da memória foi adicionada um dia após a sessão de treino, situação na qual os animais foram re-

expostos ao Contexto A (3 min), sem a apresentação de choques, para a evocação e reativação da memória de medo, com interferências realizadas imediatamente após. A sessão de reativação foi omitida do protocolo adotado para avaliar a consolidação. As sessões foram espaçadas entre si por um período de 24 h. Em alguns casos, para avaliar a duração e persistência da memória de medo, cada sessão de teste foi repetida 7 dias após o treino. Variações no protocolo geral, condições controle e detalhes específicos serão devidamente apontados durante a descrição dos resultados.

O tempo de congelamento foi quantificado (em segundos) a cada minuto usando um cronômetro e foi expresso como porcentagem de tempo de congelamento total de cada sessão. Os experimentos foram gravados por uma câmera de vídeo acoplada a um aparelho de DVD, permitindo a avaliação dos comportamentos realizados pelos animais. O experimentador permanecia na antessala, acompanhando o comportamento do animal por meio da visualização pelo monitor. A limpeza dos contextos foi feita com solução de etanol 10% (v/v) após cada uma das sessões experimentais realizadas.

2.3.4 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) tem uma plataforma central e quatro braços, sendo dois abertos (50 x 10 cm) e dois fechados por paredes (50 x 10 x 40 cm), dispostos de maneira oposta. Cada braço aberto é circundado por um anteparo de acrílico (1 cm de altura). Os animais foram submetidos a sessões de teste (5 min), que ocorreram entre as 13:00 e 17:00 h, em sala com temperatura controlada, entre 22 e 24 °C, e iluminada com uma lâmpada incandescente (100 W), com intensidade de 40 lux. Eles foram colocados na plataforma central, voltados para um dos braços fechados. Os experimentos foram gravados por uma câmera de vídeo acoplada a um aparelho de DVD, permitindo a avaliação posterior dos comportamentos realizados pelo animal. O experimentador permanecia na antessala acompanhando o comportamento do animal por meio da visualização pelo monitor. Ao final de cada sessão, a limpeza do LCE foi feita com solução de etanol 10% (v/v).

Os parâmetros comportamentais analisados durante o teste foram: número de entradas nos braços fechados (EBF) e abertos, considerados apenas quando os animais colocavam as quatro patas nesses braços; tempo de permanência nos braços abertos e fechados, quantificado desde a entrada do roedor em um braço até que uma pata fosse colocada

em outra parte do LCE e; frequência de posturas de avaliação de risco (PAR), representados pelos comportamentos de estiramento, que consiste em colocar pelo menos uma pata em um dos braços abertos e, em seguida, voltar à posição original (centro ou braço fechado). Com base nesses parâmetros, foi calculada a porcentagem de tempo nos braços abertos {%TBA; [(tempo nos braços abertos/300)×100]} e porcentagem de entrada nos braços abertos {%EBA; [entradas nos braços abertos/total de entradas nos braços abertos e fechados]×100}}.

2.3.5 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Após assegurar a distribuição normal das amostras, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias. Quando re-exposições ao mesmo contexto foram realizadas, ANOVA de medidas repetidas foi adotada. Sempre após essas análises, foi utilizado o teste *post-hoc* de Newman-Keuls, com valor de significância estatística de $P < 0,05$, para determinar as diferenças entre os grupos. O teste “t” de Student foi adotado para a comparação de dois grupos independentes, quando necessário. Os resultados foram analisados utilizando o Statistica[®] 7 (StatSoft Inc., EUA) e foram representados em gráficos confeccionados com o GraphPad Prism[®] 5 (GraphPad Prism, EUA). Quando necessário, os gráficos acompanham esquemas que indicam o protocolo experimental adotado e momentos da administração de drogas.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 A ioimbina facilita a consolidação da memória de medo

Para investigar se a ioimbina potencializa a consolidação da memória, 22 ratos foram alocados em grupos independentes (n=10-12/grupo) com base no tratamento sistêmico com veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) realizado imediatamente após a sessão de treino fraco.

A ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito do tratamento ($F_{1,20} = 35,9$; $P = 0,00001$) durante o Teste A. Houve um aumento significativo no tempo de congelamento nos Testes A₁ e A₂ no grupo tratado com ioimbina (**Fig. 8**), sugerindo que a consolidação da memória de medo foi potencializada, mantendo-se por uma semana. No Teste B, a ANOVA de medidas repetidas demonstrou um efeito do tratamento ($F_{1,20} = 7,4$; $P = 0,01$) e re-exposição ao contexto B ($F_{1,20} = 14,3$; $P = 0,001$). Embora nenhuma diferença significativa tenha sido

observada durante o Teste B₁, o grupo tratado com ioimbina apresentou um aumento significativo no tempo de congelamento durante o Teste B₂, uma semana depois. Esse resultado indica uma redução na capacidade de restringir a expressão de medo frente ao contexto apropriado ao longo do tempo, como consequência da potencialização da memória induzida pela ioimbina.

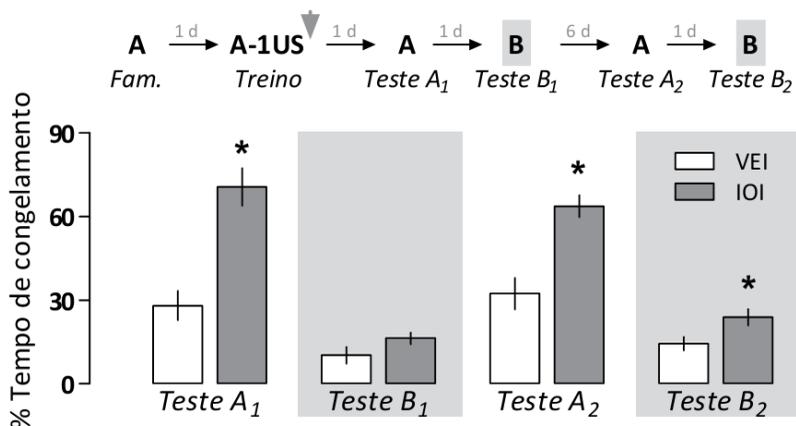


Figura 8. A ioimbina potencializa a consolidação da memória. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino fraco do condicionamento contextual. A seta indica o momento do tratamento. Valores são expressos como média ± EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Testes A₁ e A₂) ou neutro (Testes B₁ e B₂). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

A ioimbina é uma droga classicamente ansiogênica (MATTILA, SEPPALA, MATTILA, 1988; ZHENG, RINAMAN, 2013). A fim de verificar se o efeito ansiogênico é evidente nas condições experimentais e na dose adotada, 16 ratos foram distribuídos em 2 grupos ($n=8$ /grupo) que receberam veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) por via sistêmica 30 min antes de serem expostos ao LCE. Animais tratados com ioimbina apresentaram uma redução na %TBA ($t_{14} = 4,9$; $P = 0,04$) e %EBA ($t_{14} = 6,06$; $P = 0,03$), caracterizando um efeito ansiogênico (Fig. 9), sem qualquer alteração quanto as PAR ($t_{14} = 0,08$; $P = 0,77$). Não houve alteração quanto às EBF ($t_{14} = 0,38$; $P = 0,54$), indicando atividade exploratória geral normal.

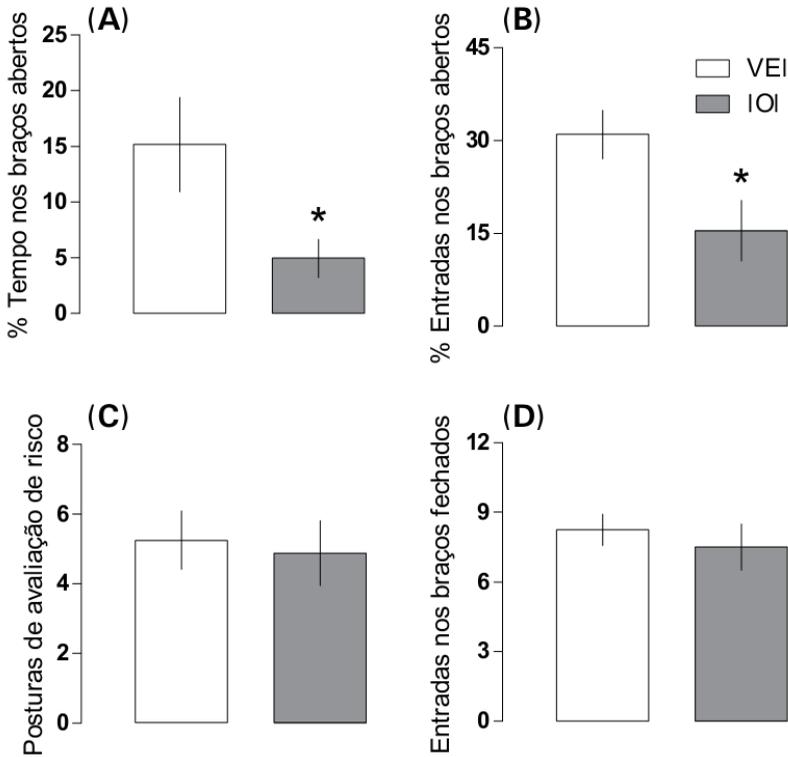


Figura 9. A ioimbina tem efeito tipo-ansiolítico no labirinto em cruz elevado. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes do teste. Valores são expressos como média \pm EPM da (A) porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA), (B) porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA), (C) número de posturas de avaliação de risco (PAR) e (D) número de entradas nos braços fechados (EBF). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste “t” de Student para grupos independentes).

Como o efeito ansiolítico de drogas pode funcionar, *per se*, como um estímulo incondicionado na formação de memórias aversivas (GUITTON, DUDAI, 2004; CAVALLI, BERTOGLIO, CAROBREZ, 2009), essa poderia ser uma interpretação alternativa para os resultados anteriores (*e.g.*, uma simples potencialização das respostas defensivas). Para investigar essa possibilidade, 18 animais foram separados em 2 grupos ($n=8-10$ /grupo) que receberam veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) imediatamente após a exposição ao Contexto A, sem a aplicação de

choques nas patas (sessão “sem pareamento”, ao invés da sessão do treino fraco). Ambos os grupos se comportaram de maneira similar durante os Testes A e B (**Tab. 1**), sugerindo que, nas condições adotadas, a ioimbina não foi capaz de agir como um estímulo incondicionado e induzir o condicionamento contextual por si só.

Tabela 1. A ioimbina não age como um estímulo incondicionado.

	Veículo (n=10)	Ioimbina (n=8)	Análise estatística
Teste A	21,2 ± 5,2	16,5 ± 2,7	$t_{16} = 0,54; P = 0,47$
Teste B	11,8 ± 2,3	14,0 ± 2,4	$t_{16} = 0,45; P = 0,51$

Veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados imediatamente após a sessão “sem pareamento” no Contexto A (sessão idêntica ao treino fraco, mas com a omissão do choque elétrico). Os dados são representados como média ± EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto A (Teste A) ou B (Teste B) (teste “t” de Student para grupos independentes).

Como os níveis de congelamento observados frente ao Contexto A são semelhantes em animais sem pareamento ou quando apenas 1 choque foi aplicado, não existem evidências comportamentais de que essa memória foi evocada e expressa frente à re-exposição ao Contexto A, podendo-se argumentar que não houve, de fato, a formação de um traço de memória. Por conta disso, o desempenho dos animais que receberam 0 ou 1 choques, tratados com veículo ou ioimbina, encontrados nos experimentos anteriores durante a re-exposição ao Contexto A foi comparado (**Tab. 2**). A ANOVA de duas vias indicou um efeito do tratamento ($F_{1,36} = 14,7; P = 0,0005$), número de choques ($F_{1,36} = 31,1; P = 0,000003$) e uma interação entre esses fatores ($F_{1,36} = 22,3; P = 0,00004$). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos tratados com veículo que receberam ou não choques nas patas. Como a ioimbina só foi capaz de aumentar o tempo de congelamento no grupo pareado com choque, esse resultado sugere que um traço de memória contextual de medo pode causar alterações comportamentais sutis – e até mesmo indetectáveis – que poderiam alcançar diferenças significativas frente a sua potencialização. Nesse sentido, é provável que outros comportamentos além do congelamento, como a vocalização ultrassônica emitida por roedores em situações aversivas (WÖHR, BORTA, SCHWARTING, 2005), sejam evidentes em animais que receberam um choque, embora essa possibilidade não tenha sido avaliada.

Tabela 2. O pareamento com um choque leva à formação de um traço de memória que pode ser potencializado pela ioimbina.

Teste A		
Número de choques	Veículo	Ioimbina
0	21,2 ± 5,2	16,5 ± 2,8
1	25,7 ± 4,7	70,7 ± 6,7*

Veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados imediatamente após a sessão “sem pareamento” no Contexto A ou com o treino fraco do condicionamento contextual. Os dados são representados como média ± EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto A (Teste A). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Como a consolidação da memória é gradual e leva algumas horas (DUDAI, 2004), 20 ratos foram alocados em 2 grupos (n=10/grupo) que receberam veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) 6 h após a sessão de treino fraco para investigar se essa droga causou uma interferência específica sobre essa etapa de estabilização da memória. Ambos os grupos se comportaram de maneira similar durante os Testes A e B (Tab. 3), indicando que o efeito da ioimbina é restrito à janela de consolidação da memória.

Tabela 3. A ioimbina não apresenta efeito quando administrada 6 h após o treino.

	Veículo (n=10)	Ioimbina (n=10)	Análise estatística
Teste A	26,0 ± 1,3	24,9 ± 1,9	$t_{18} = 0,20; P = 0,66$
Teste B	11,6 ± 0,6	12,4 ± 0,9	$t_{18} = 0,54; P = 0,47$

Veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados 6 h após a sessão de treino fraco do condicionamento contextual. Os dados são representados como média ± EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B) (Teste “t” de Student para grupos independentes).

2.4.2 A ioimbina facilita a reconsolidação da memória de medo

Para investigar se a ioimbina também potencializa a reconsolidação do traço de memória, 19 ratos foram alocados em grupos independentes (n=9-10/grupo) com base no tratamento sistêmico com

veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) realizado imediatamente após a sessão de reativação da memória.

A ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito do tratamento ($F_{1,17} = 13,9$; $P = 0,001$) e re-exposição ao Contexto A ($F_{2,34} = 11,4$; $P = 0,0001$), além de uma interação entre esses fatores ($F_{2,34} = 11,7$; $P = 0,0001$) durante as exposições ao Contexto A. Embora ambos os grupos tenham apresentado níveis baixos e comparáveis de congelamento durante a sessão de reativação, o grupo tratado com ioimbina apresentou um aumento significativo nesse parâmetro nos Testes A₁ e A₂ (**Fig. 10**), sugerindo que a reconsolidação da memória de medo foi potencializada, com efeito duradouro. Todos os grupos apresentaram níveis baixos de congelamento durante os Testes B₁ e B₂ (tratamento: $F_{1,17} = 1,5$; $P = 0,23$; re-exposição ao Contexto B: $F_{1,17} = 3,0$; $P = 0,1$).

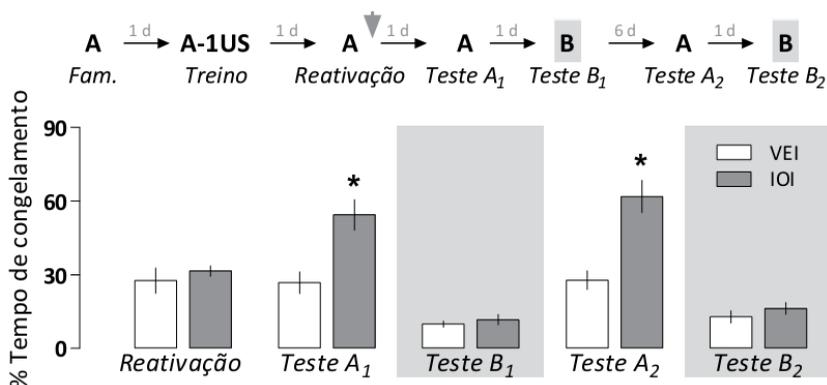


Figura 10. A ioimbina potencializa a reconsolidação da memória. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de reativação da memória de medo contextual. A seta indica o momento do tratamento. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Reativação, Testes A₁ e A₂) ou neutro (Testes B₁ e B₂). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Uma vez que a evocação – que inclui a reativação e labilização do traço de memória como etapa inicial – é necessária para desencadear a reconsolidação (ALBERINI, 2011), um experimento controle foi realizado para investigar a especificidade do efeito da ioimbina sobre essa etapa da memória. Para isso, 15 animais foram alocados em 2 grupos ($n=7-8/\text{grupo}$) com base no tratamento sistêmico com veículo ou

ioimbina (1,0 mg/kg) administrados imediatamente após a exposição ao Contexto B, a fim de omitir a reativação da memória (sessão “sem reativação”). Ambos os grupos se comportaram de maneira similar durante as exposições aos Contextos A e B (**Tab. 4**), sugerindo que o efeito da ioimbina depende da evocação prévia da memória, *i.e.*, um efeito direto sobre a reconsolidação.

Tabela 4. O efeito da ioimbina sobre a reconsolidação da memória depende da sua evocação/reativação prévia.

	Veículo (n=7)	Ioimbina (n=8)	Análise estatística
Sem reativação	13,0 ± 2,3	13,5 ± 1,4	$t_{13} = 0,80; P = 0,38$
Teste A	26,8 ± 0,9	25,4 ± 1,8	$t_{13} = 0,43; P = 0,52$
Teste B	14,3 ± 2,3	15,9 ± 0,9	$t_{13} = 0,47; P = 0,50$

Veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados imediatamente após uma sessão “sem reativação” da memória de medo contextual, no Contexto B. Os dados são representados como média ± EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (sessão “sem reativação” e Teste B) (Teste “t” de Student para grupos independentes).

Assim como a consolidação, a etapa de reconsolidação compartilha a sua natureza gradual, sendo delimitada temporalmente em uma janela de algumas horas (DUDAI, 2004; ALBERINI, LEDOUX, 2013). Para investigar se a facilitação da memória de medo induzida pela ioimbina foi específica por modulação da reconsolidação, 20 animais foram alocados em 2 grupos (n=10/grupo) com base no tratamento sistêmico com veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) realizado 6 h após a sessão de reativação da memória. Ambos os grupos se comportaram de maneira similar durante a sessão de reativação, Testes A e B (**Tab. 5**), indicando a omissão do efeito da ioimbina quando a administração é realizada fora da janela temporal de reconsolidação da memória.

Tabela 5. A ioimbina não apresenta efeito quando administrada 6 h após a reativação da memória.

	Veículo (n=10)	Ioimbina (n=10)	Análise estatística
Reativação	24,5 ± 2,1	24,8 ± 1,1	^a $F_{1,18} = 0,30; P = 0,59$
Teste A	23,0 ± 1,1	24,8 ± 1,3	^b $F_{1,18} = 0,60; P = 0,44$
Teste B	10,3 ± 0,9	9,7 ± 1,0	^c $t_{18} = 0,15; P = 0,70$

Veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados por 6 h após a sessão de reativação da memória de medo contextual. Os dados são representados como média ± EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Reativação e Teste A) ou neutro (Testes B) (ANOVA com medidas repetidas para os fatores ^atratamento e ^bre-exposição ao contexto A ou ^cTeste “t” de Student para grupos independentes).

2.4.3 A ativação de receptores α_2 -adrenérgicos prejudica as fases de estabilização da memória de medo

Como contraprova de que os efeitos causados pela ioimbina foram mediados pelo antagonismo de receptores α_2 -adrenérgicos, os próximos experimentos visaram verificar a habilidade da clonidina, um agonista seletivo desses receptores, em prejudicar a memória de medo contextual. Para tanto, 53 animais foram divididos em 6 grupos (n=8-10/grupo) com base no tratamento sistêmico com veículo ou clonidina (0,1 ou 0,3 mg/kg) realizado imediatamente após a sessão de treino (para inferências sobre a consolidação) ou reativação (para inferências sobre a reconsolidação). Nesse caso foi utilizado o treino forte, com 3 choques (0,7 mA, 60 Hz, por 3 s), para induzir a formação de uma memória de medo robusta. Nessa condição, a expressão substancial de congelamento frente ao contexto A facilitaria a observação de efeitos prejudiciais sobre o processamento da memória.

Para o protocolo de consolidação, a ANOVA de uma via indicou um efeito do tratamento durante o Teste A ($F_{2,24} = 6,3; P = 0,006$), sem qualquer diferença significativa durante o Teste B ($F_{2,24} = 0,24; P = 0,78$). Apenas a maior dose de clonidina reduziu o tempo de congelamento durante o Teste A de maneira significativa (**Fig. 11**), indicando um prejuízo na consolidação da memória.

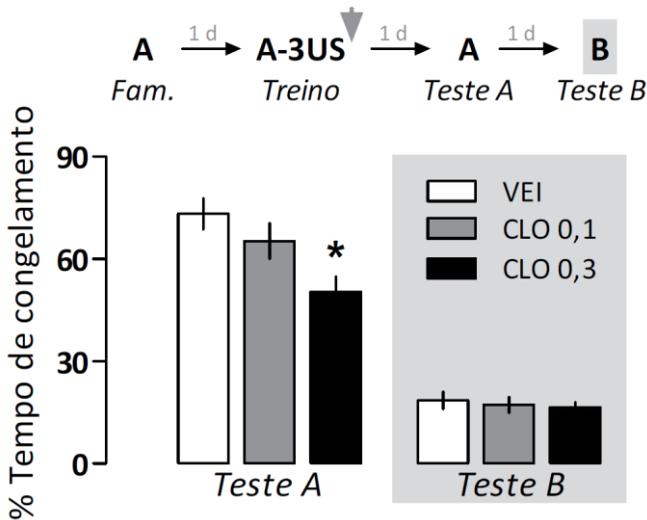


Figura 11. A clonidina prejudica a consolidação da memória. Veículo (VEI) ou clonidina (CLO; 0,1 ou 0,3 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual. A seta indica o momento do tratamento. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Para o protocolo de reconsolidação, a ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito do tratamento ($F_{2,23} = 10,7$; $P = 0,0005$) e re-exposição ao mesmo contexto ($F_{1,23} = 38,9$; $P = 0,000002$), além de uma interação entre esses fatores ($F_{2,23} = 17,8$; $P = 0,00002$) durante as exposições ao Contexto A. Embora todos os grupos apresentem um perfil similar de congelamento durante a sessão de reativação, a maior dose de clonidina reduziu essa resposta durante o Teste A (**Fig. 12**), indicando um prejuízo na reconsolidação da memória. Adicionalmente, nenhuma diferença significativa foi observada durante o Teste B nesse caso ($F_{2,23} = 0,32$; $P = 0,72$). Portanto, a ativação de receptores α_2 -adrenérgicos prejudica as duas etapas de estabilização da memória, supostamente por reduzir o tônus noradrenérgico.

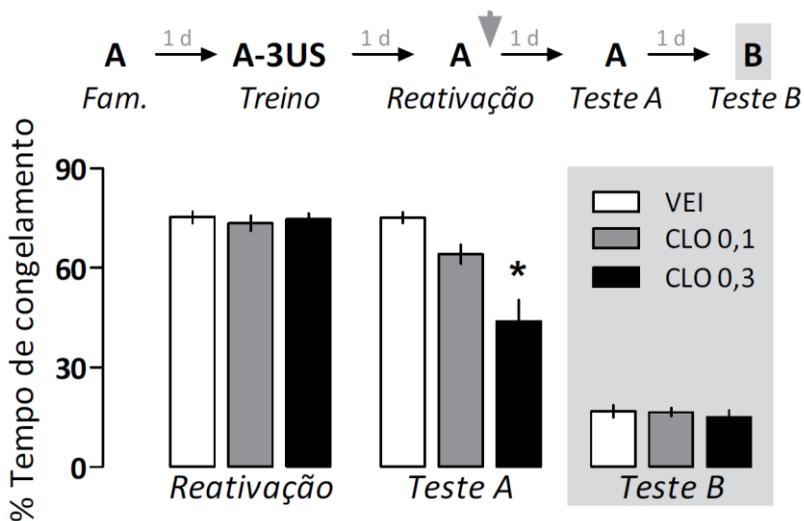


Figura 12. A clonidina prejudica a reconsolidação da memória. Veículo (VEI) ou clonidina (CLO; 0,1 ou 0,3 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de reativação da memória de medo contextual. A seta indica o momento do tratamento. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Reativação, Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Uma vez que a clonidina pode alterar as respostas locomotoras e emocionais, o que comprometeria a interpretação dos resultados prévios, 18 ratos foram alocados em 2 grupos ($n=9$ /grupo) com base no tratamento sistêmico com veículo ou a dose efetiva de clonidina (0,3 mg/kg) realizado 24 h antes da exposição no LCE. O teste só foi realizado no dia seguinte a fim de verificar a ocorrência de efeitos locomotores e/ou emocionais duradouros que pudessem justificar as alterações comportamentais observadas no experimento anterior, coincidindo com o momento em que os animais foram expostos ao Contexto A (24 h após o tratamento). A dose selecionada não causou alterações locomotoras e/ou emocionais evidentes no LCE que pudessem justificar os efeitos observados em testes realizados no dia seguinte (**Tab. 6**).

Tabela 6. A clonidina não interfere com a ansiedade e a atividade exploratória geral no labirinto em cruz elevado.

	Veículo (n=9)	Clonidina (n=9)	Análise estatística
%TBA	14,7 ± 3,3	12,5 ± 2,1	$t_{16} = 0,30; P = 0,59$
%EBA	34,4 ± 2,9	32,3 ± 1,4	$t_{16} = 0,39; P = 0,54$
PAR	4,3 ± 0,4	4,6 ± 0,4	$t_{16} = 0,33; P = 0,57$
EBF	6,4 ± 0,7	7,1 ± 0,5	$t_{16} = 0,60; P = 0,45$

Veículo ou clonidina (0,3 mg/kg, i.p.) foram administrados e os grupos foram testados no labirinto em cruz elevado 24 h após, coincidindo com o momento em que seu efeito sobre a consolidação/reconsolidação foram investigados nos experimentos anteriores. %TBA, porcentagem de tempo nos braços abertos; %EBA, porcentagem de entradas nos braços abertos; PAR, número de posturas de avaliação de risco e; EBF, número de entradas nos braços fechados. Os dados são representados como média ± EPM (Teste “t” de Student para grupos independentes).

2.4.4 Existe um recrutamento diferencial dos receptores α_1 - e β -adrenérgicos durante a consolidação e reconsolidação de uma memória adaptativa

O efeito da ioimbina em facilitar a consolidação e reconsolidação pode ser atribuído à capacidade do antagonismo de receptores α_2 -adrenérgicos em aumentar a liberação de noradrenalina no cérebro. Se essa premissa for verdadeira, o efeito final supostamente resultaria da ativação de diferentes subtipos de receptores adrenérgicos, sendo possível prevenir esse efeito com antagonistas seletivos. Como tanto receptores α_1 - e β -adrenérgicos podem modular o processamento de memórias emocionais, a contribuição relativa desses receptores para o efeito da ioimbina foi investigada utilizando o antagonista seletivo de receptores α_1 prazosin (0,5 mg/kg) ou o antagonista não-seletivo de receptores β propranolol (10 mg/kg). Para tanto, 108 ratos foram alocados em 12 grupos (n=8-11/grupo) de acordo com o pré-tratamento sistêmico (veículo, prazosin ou propranolol) realizado imediatamente após a sessão de treino fraco (para inferências sobre a consolidação) ou reativação (para inferências sobre a reconsolidação), e o tratamento (veículo ou 1,0 mg/kg de ioimbina) realizado 10 min depois.

Para a consolidação, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do pré-tratamento ($F_{2,48} = 10,3; P = 0,0002$) e tratamento ($F_{1,48} = 67,5; P = 0,0000001$), bem como uma interação entre esses fatores ($F_{2,48} = 11,62; P = 0,00008$) durante a re-exposição ao Contexto

A. A ioimbina aumentou a expressão de congelamento nos animais pré-tratados com veículo ou prazosin durante o Teste A (**Fig. 13**). No entanto, esse efeito foi prevenido pelo pré-tratamento com propranolol, quando comparado ao respectivo controle ou ao grupo veículo-ioimbina. Um padrão parecido foi observado durante o Teste B, onde a ANOVA de duas vias evidenciou um efeito significativo do tratamento ($F_{2,48} = 18,1$; $P = 0,0001$). Animais tratados com ioimbina apresentaram um aumento no tempo de congelamento durante a exposição ao contexto neutro quando comparados ao respectivo grupo controle. Novamente, o pré-tratamento com propranolol, mas não com prazosin, foi capaz de prevenir esse efeito. Em conjunto, esses resultados reforçam que o efeito facilitatório da ioimbina sobre a consolidação da memória acontece por uma potencialização noradrenérgica, e parece ser mediado preferencialmente por receptores β -adrenérgicos. Além disso, os resultados sugerem que o próprio aumento da expressão de medo frente ao contexto neutro também depende de mecanismos semelhantes durante a consolidação da memória.

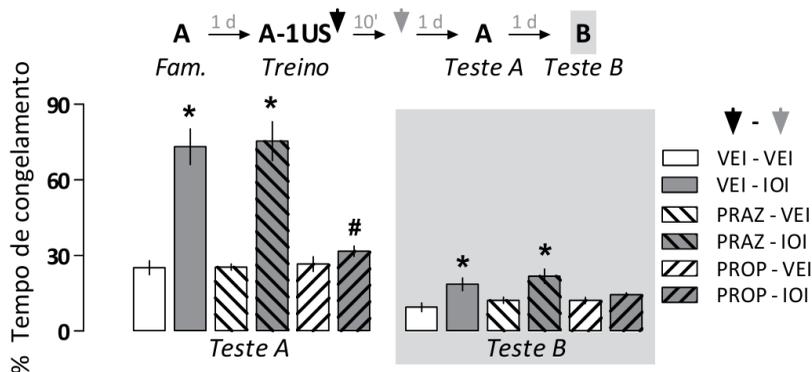


Figura 13. Os receptores β -adrenérgicos são necessários para o efeito da ioimbina sobre a consolidação da memória. Veículo (VEI), o antagonista α_1 prazosin (PRAZ; 0,5 mg/kg) ou o antagonista β propranolol (PROP; 10 mg/kg) foram administrados por via sistêmica (i.p.) logo após a sessão de treino fraco do condicionamento contextual, seguido, 10 min após, pela administração de veículo ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg). As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo grupo controle e # indica uma diferença significativa em relação ao grupo VEI-IOI (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

No protocolo de reconsolidação, a ANOVA de duas vias com repetição indicou um efeito significativo do pré-tratamento ($F_{2,48} = 5,02$; $P = 0,01$), tratamento ($F_{1,48} = 19,9$; $P = 0,00005$) e re-exposição ao mesmo contexto ($F_{1,48} = 46,8$; $P = 0,0000001$), bem como uma interação entre todos esses fatores ($F_{2,48} = 12,2$; $P = 0,00005$) durante as exposições ao Contexto A. Todos os animais apresentaram níveis baixos de congelamento frente a sessão de reativação (**Fig. 14**). O grupo que recebeu ioimbina e foi pré-tratado com veículo expressou maior tempo de congelamento que o respectivo controle durante o Teste A. No entanto, esse efeito foi atenuado nos grupos pré-tratados com prazosin ou propranolol, com redução no tempo de congelamento quando comparado ao grupo veículo-ioimbina. Esse resultado confirma a potencialização noradrenérgica como mecanismo final para a facilitação da reconsolidação induzida pela ioimbina, além de indicar que tanto os receptores α_1 - quanto β -adrenérgicos parecem ser recrutados nesse caso. Durante o Teste B, nenhum efeito significativo foi observado (pré-tratamento: $F_{2,48} = 0,52$; $P = 0,59$; tratamento: $F_{1,48} = 0,48$; $P = 0,32$).

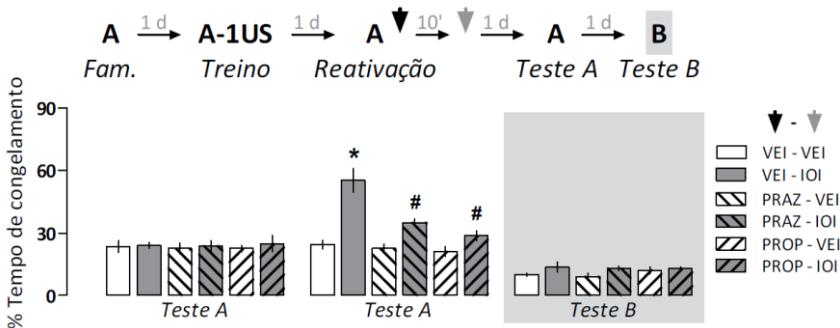


Figura 14. A ativação de receptores α_1 - e β -adrenérgicos é necessária para o efeito da ioimbina sobre a reconsolidação da memória. Veículo (VEI), o antagonista α_1 prazosin (PRAZ; 0,5 mg/kg) ou o antagonista β propranolol (PROP; 10 mg/kg) foram administrados por via sistêmica (i.p.) logo após a sessão de reativação da memória de medo contextual, seguido, 10 min após, pela administração de veículo ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg). As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Reativação e Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo grupo controle e # indica uma diferença significativa em relação ao grupo VEI-IOI (ANOVA de duas vias com ou sem repetição seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Os receptores α_2 -adrenérgicos também são expressos periféricamente, como na medula adrenal, onde exercem controle sobre a liberação de adrenalina (BYLUND, 2007). Embora a adrenalina não atravesse a barreira hematoencefálica, a sua ação periférica, por ativação de receptores β -adrenérgicos presentes em terminações do nervo vago, causa a estimulação do *locus coeruleus* (CHEN, WILLIAMS, 2012). Se os resultados acima demonstrados dependerem principalmente da ativação dessa via, o pré-tratamento com nadolol, um antagonista não-seletivo de receptores β -adrenérgicos que não atravessa a barreira hematoencefálica (CRUICKSHANK, PRICHARD, 1987), por conta do seu caráter altamente hidrofílico, seria capaz de prevenir os efeitos da ioimbina. Para testar essa possibilidade, 114 animais foram divididos em 12 grupos ($n=8-11$ /grupo) com base no pré-tratamento sistêmico com veículo ou nadolol (10 mg/kg) realizado imediatamente após a sessão de treino fraco (para inferências sobre a consolidação) ou reativação (para inferências sobre a reconsolidação) e o tratamento, 10 min depois, com veículo, ioimbina (1,0 mg/kg) ou adrenalina (0,1 mg/kg). A adrenalina foi utilizada como controle positivo de modulação periférica sobre as memórias.

Para o protocolo de consolidação, a ANOVA de duas vias indicou um efeito geral do pré-tratamento ($F_{1,52} = 17,6$; $P = 0,0001$), tratamento ($F_{2,52} = 40,5$; $P = 0,0000001$) e uma interação entre esses fatores ($F_{2,52} = 14,8$; $P = 0,00001$) durante o Teste A. Tanto a ioimbina quanto a adrenalina foram capazes de aumentar o tempo de congelamento durante o Teste A, mas o nadolol só preveniu o efeito induzido pela adrenalina (**Tab. 7**). Durante o Teste B, a ANOVA de duas vias apontou um efeito do tratamento ($F_{2,52} = 7,8$; $P = 0,001$), com aumento do tempo de congelamento apenas nos grupos tratados com ioimbina, de maneira independente dos pré-tratamentos.

Tabela 7. O efeito da ioimbina na consolidação depende da ativação central de receptores β -adrenérgicos.

	Teste A	Teste B
VEI – VEI (n=8)	25,1 \pm 2,8	9,4 \pm 1,7
VEI – IOI (n=11)	73,2 \pm 7,1*	18,6 \pm 2,6*
VEI – ADR (n=10)	77,5 \pm 5,6*	13,2 \pm 2,0
NAD – VEI (n=9)	27,2 \pm 1,6	9,6 \pm 1,4
NAD – IOI (n=10)	68,0 \pm 1,9*	15,3 \pm 1,8*
NAD – ADR (n=10)	30,4 \pm 5,4	10,6 \pm 1,3

Veículo (VEI) ou o antagonista β com ação restrita à periferia nadolol (NAD; 10 mg/kg) foram administrados por via sistêmica (i.p.) imediatamente após a sessão de treino fraco do condicionamento contextual, seguida pela administração de veículo, ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg) ou adrenalina (ADR; 0,1 mg/kg) 10 min após. Os dados são representados como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Para a reconsolidação, a ANOVA de duas vias com repetição indicou um efeito geral do pré-tratamento ($F_{1,50} = 24,5$; $P = 0,00001$), tratamento ($F_{2,50} = 31,6$; $P = 0,0000001$) e re-exposições ao mesmo contexto ($F_{1,50} = 249,6$; $P = 0,0000001$), bem como uma interação entre todos esses fatores ($F_{2,50} = 29,4$; $P = 0,0000001$) durante as exposições ao Contexto A. Embora todos os grupos tenham apresentado níveis similares de congelamento durante a reativação, tanto a ioimbina quanto a adrenalina aumentaram o tempo de congelamento durante o Teste A, e o nadolol, novamente, preveniu apenas o efeito induzido pela adrenalina (**Tab. 8**). Durante o Teste B, nenhuma diferença significativa foi observada (pré-tratamento: $F_{1,50} = 0,01$; $P = 0,92$; tratamento: $F_{2,50} = 2,92$; $P = 0,06$), embora uma tendência em aumentar o congelamento frente ao contexto neutro tenha sido observada nos grupos tratados com ioimbina. De maneira geral, esses resultados sugerem que o efeito mediado pela ioimbina resulta de um bloqueio de receptores α_2 -adrenérgicos localizados no sistema nervoso central, com pouca contribuição daqueles expressos na periferia.

Tabela 8. O efeito da ioimbina na reconsolidação depende da ativação central de receptores β -adrenérgicos.

	Reativação	Teste A	Teste B
VEI – VEI (n=8)	23,5 ± 2,8	24,4 ± 2,1	10,0 ± 0,8
VEI – IOI (n=9)	24,0 ± 1,4	55,2 ± 5,6*	13,4 ± 2,4
VEI – ADR (n=11)	22,8 ± 0,9	70,8 ± 2,9*	11,2 ± 1,5
NAD – VEI (n=9)	21,3 ± 0,9	21,1 ± 1,2	10,5 ± 0,6
NAD – IOI (n=9)	25,4 ± 2,2	51,4 ± 2,0*	13,3 ± 0,7
NAD – ADR (n=10)	21,3 ± 2,7	28,5 ± 2,5	10,5 ± 0,9

Veículo (VEI) ou o antagonista β com ação restrita à periferia nadolol (NAD; 10 mg/kg) foram administrados por via sistêmica (i.p.) imediatamente após a sessão de reativação da memória de medo contextual, seguida pela administração de veículo, ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg) ou adrenalina (ADR; 0,1 mg/kg) 10 min após. Os dados são representados como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Reativação, Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo grupo controle (ANOVA de duas vias com ou sem repetição seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

2.4.5 A facilitação noradrenérgica repetida da memória de medo pode causar generalização

Experimentos anteriores demonstraram que o tratamento com ioimbina pode causar certo grau de generalização de medo (ver **Fig. 8** e **Tab. 7**). Para determinar os fatores que levariam à indução dessa característica inapropriada e avaliar a capacidade da ioimbina em reforçar sequencialmente a consolidação e reconsolidação de um traço de memória contextual de medo, 22 ratos foram separados em 2 grupos (n=10-12/grupo) que receberam veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) imediatamente após a sessão de treino fraco e reativação da memória.

A ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito do tratamento durante as exposições ao Contexto A ($F_{1,17} = 104,8$; $P = 0,0000001$). O grupo tratado com ioimbina apresentou maior tempo de congelamento durante a sessão de reativação (**Fig. 15**), demonstrando a facilitação da consolidação. Com a segunda administração da droga, houve uma tendência ($P = 0,10$) em aumentar ainda mais o congelamento durante os Testes A₁ e A₂. A apresentação de um nível “teto” de congelamento (~ 85%) após o primeiro tratamento pode ter tornado pouco provável que uma segunda injeção induzisse qualquer aumento significativo. A possibilidade de que aumentos adicionais no congelamento não

aconteceram por conta disso é uma hipótese a ser testada mais adiante. De maneira importante, a dupla administração de ioimbina também causou um aumento significativo e duradouro do congelamento frente ao contexto neutro. A ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito do tratamento durante a exposição ao Contexto B ($F_{1,17} = 55,4$; $P = 0,000001$), sendo que os animais tratados com ioimbina apresentaram níveis de congelamento mais altos durante os Testes B₁ e B₂, caracterizando a generalização do medo.

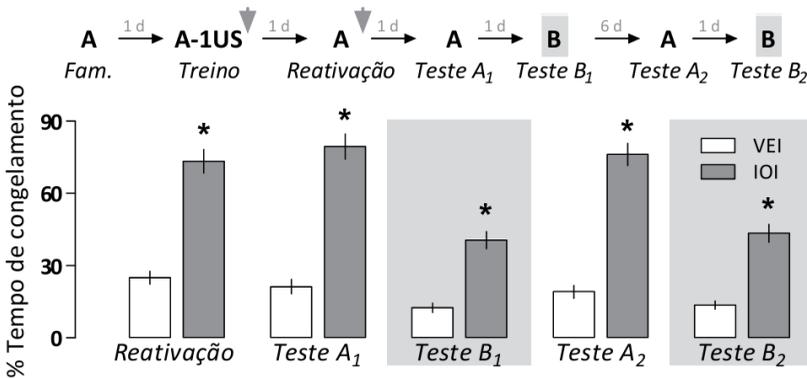


Figura 15. A potencialização sequencial da consolidação e reconsolidação da memória induz generalização do medo. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino fraco do condicionamento contextual e reativação dessa memória. As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Reativação, Teste A₁ e A₂) ou neutro (Teste B₁ e B₂). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

No experimento anterior, a segunda administração de ioimbina (após a reativação da memória) induziu a generalização do medo, mas não foi capaz de aumentar a expressão de congelamento frente ao Contexto A, supostamente por ter sido atingido um nível máximo da resposta condicionada. Para investigar essa possibilidade, 20 animais foram divididos em 2 grupos ($n=10$ /grupo) que receberam veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) imediatamente após duas sessões consecutivas de reativação da memória, realizadas em um intervalo de 24 h. A ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito do tratamento ($F_{1,18} = 48,4$; $P = 0,000002$) e re-exposição a Contexto A ($F_{3,54} = 55,9$; $P = 0,0000001$), bem como uma interação entre esses fatores ($F_{3,54} = 52,5$; $P =$

0,0000001). Ambos os grupos apresentaram níveis similares de congelamento durante a primeira sessão de reativação, mas o grupo posteriormente tratado com ioimbina expressou mais comportamento de congelamento durante a segunda sessão de reativação que o grupo controle (Fig. 16). Na exposição subsequente ao Contexto A (Teste A₁), um aumento adicional no congelamento foi observado no grupo tratado quando comparado ao expresso no dia anterior no mesmo grupo, sendo que esse aumento perdurou até o Teste A₂, uma semana depois. Portanto, quando o nível máximo de congelamento não é alcançado, uma segunda potencialização da reconsolidação com a administração de ioimbina pode intensificar, ainda mais, a expressão da resposta condicionada. Adicionalmente, a ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito da re-exposição ao Contexto B ($F_{1,18} = 50,1$; $P = 0,000001$), relacionado ao aumento sutil na resposta defensiva ao longo do tempo, mas sem qualquer diferença quanto ao tratamento ($F_{1,18} = 0,17$; $P = 0,68$).

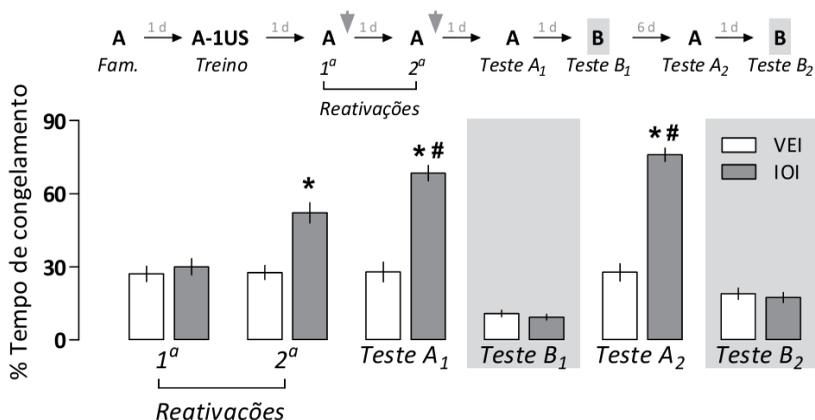


Figura 16. A potencialização consecutiva da reconsolidação da memória aumenta a expressão de congelamento frente ao contexto pareado. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após cada uma das duas sessões de reativação da memória de medo contextual. As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Reativações, Teste A₁ e A₂) ou neutro (Teste B₁ e B₂). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle e # indica uma diferença significativa em relação ao mesmo grupo, durante a segunda reativação (ANOVA com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

No experimento anterior, não houve indução da generalização do medo, mesmo com duas injeções de ioimbina após as sessões de reativação. Para investigar se esse resultado deriva de uma diferença qualitativa entre a consolidação e reconsolidação (*i.e.*, a generalização do medo só seria induzida quando existe a potencialização da consolidação da memória) ou quantitativa (*i.e.*, após atingir o nível “teto” de congelamento, uma potencialização adicional, em qualquer uma das etapas de estabilização da memória, resultaria em generalização do medo), 18 animais foram divididos em 2 grupos ($n=9/\text{grupo}$) que receberam veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) imediatamente após três sessões consecutivas de reativação da memória, realizadas em um intervalo de 24 h cada. A ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito do tratamento ($F_{1,16} = 421,6$; $P = 0,0000001$) e re-exposição ao Contexto A ($F_{4,64} = 123,9$; $P = 0,0000001$), bem como uma interação entre esses fatores ($F_{4,64} = 106,8$; $P = 0,0000001$). Ambos os grupos apresentaram níveis similares de congelamento durante a primeira sessão de reativação, mas o grupo posteriormente tratado com ioimbina expressou mais congelamento durante a segunda e terceira sessões de reativação em comparação ao grupo controle, com aumento gradual nessa resposta ao longo delas (**Fig. 17**). No dia seguinte, durante o Teste A₁, nenhum aumento adicional no tempo de congelamento foi observado no grupo que recebeu a terceira injeção de ioimbina, indicando que o nível máximo desse comportamento foi atingido. Esse grupo continuou apresentando níveis de congelamento próximos ao máximo, quando comparados ao grupo controle, durante os Testes A₁ e A₂. Adicionalmente, a administração tripla de ioimbina foi capaz de induzir um aumento duradouro na resposta de medo frente ao contexto neutro (Testes B₁ e B₂). A ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito do tratamento ($F_{1,16} = 108,5$; $P = 0,0000001$) e re-exposições ao Contexto B ($F_{1,16} = 4,75$; $P = 0,04$), indicando um aumento na resposta defensiva ao longo do período de teste. Esse resultado sugere que a generalização do medo é um fenômeno relacionado quantitativamente aos níveis de resposta condicionada, independente do efeito específico da ioimbina sobre uma das fases de estabilização da memória.

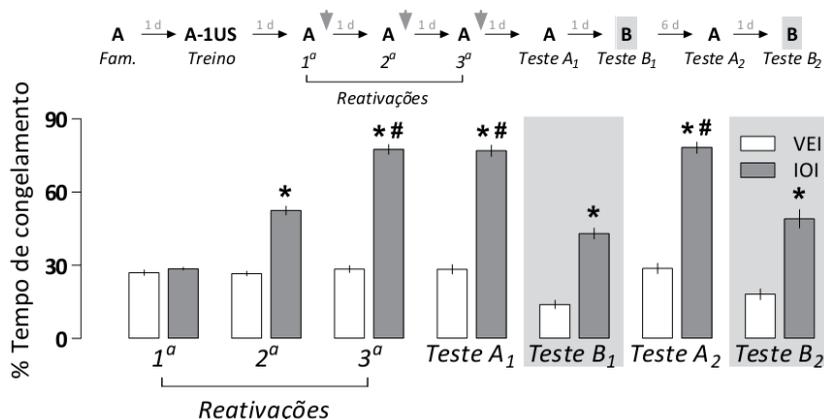


Figura 17. Após atingir níveis máximos de congelamento, a potencialização da reconsolidação da memória induz generalização do medo. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após cada uma das três sessões de reativação da memória de medo contextual. As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Reativações, Teste A₁ e A₂) ou neutro (Teste B₁ e B₂). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle e # indica uma diferença significativa em relação ao mesmo grupo, durante a segunda reativação (ANOVA com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

2.4.6 A generalização do medo requer a ativação de receptores β -adrenérgicos

Seguindo a premissa de que a generalização do medo depende quantitativamente dos níveis de congelamento, seria possível induzir esse perfil comportamental frente a uma única administração da droga em um desses momentos, utilizando o protocolo de treino forte, com 3 choques. Como existem diferenças quanto ao recrutamento de receptores adrenérgicos durante a potencialização de memórias de medo menos intensas, pode-se pensar que o mesmo poderia acontecer para a indução da generalização do medo e geração dessa memória inapropriada. Para avaliar essa possibilidade, 104 animais foram divididos em 12 grupos ($n=8-10$ /grupo) de acordo com o pré-tratamento sistêmico (veículo, 0,5 mg/kg de prazosin ou 10 mg/kg de propranolol) realizado imediatamente após a sessão de treino forte (para inferências sobre a consolidação) ou reativação (para inferências sobre a reconsolidação) e o tratamento administrado 10 min depois (veículo ou 1,0 mg/kg de ioimbina).

No protocolo de consolidação, todos os grupos apresentaram níveis semelhantes de congelamento durante o Teste A (pré-tratamento: $F_{2,48} = 0,20$; $P = 0,81$; tratamento: $F_{1,48} = 0,06$; $P = 0,79$), indicando que o nível máximo de congelamento foi alcançado. Durante o Teste B, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do pré-tratamento ($F_{2,48} = 4,13$; $P = 0,02$) e tratamento ($F_{1,48} = 19,5$; $P = 0,00006$), bem como uma interação entre esses fatores ($F_{2,48} = 8,43$; $P = 0,0007$). A ioimbina aumentou a expressão de congelamento nos animais pré-tratados com veículo ou prazosin quando comparado aos respectivos controles durante o Teste B (**Fig. 18**). O pré-tratamento com propranolol preveniu esse efeito quando comparado ao respectivo controle ou ao grupo veículo-ioimbina, um resultado que sugere a participação de receptores β -adrenérgicos para a indução da generalização do medo durante a consolidação da memória.

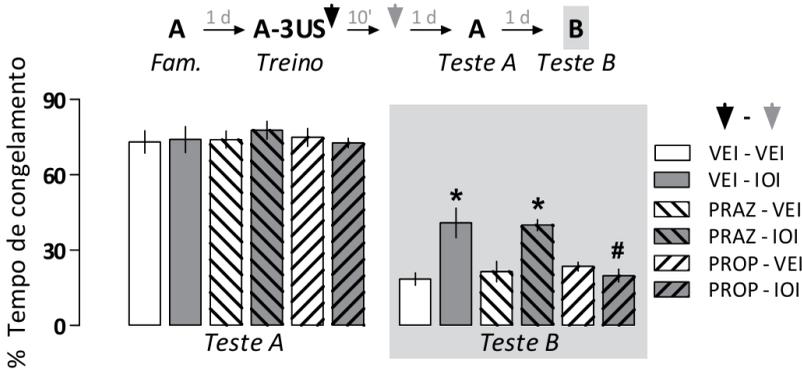


Figura 18. A generalização do medo induzida pela ioimbina durante a consolidação de uma memória intensa requer a ativação de receptores β -adrenérgicos. Veículo (VEI), o antagonista α_1 prazosin (PRAZ; 0,5 mg/kg) ou o antagonista β propranolol (PROP; 10 mg/kg) foram administrados por via sistêmica (i.p.) logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual, seguido, 10 min após, pela administração de veículo ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg). As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo grupo controle e # indica uma diferença significativa em relação ao grupo VEI-IOI (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

No protocolo de reconsolidação, todos os grupos apresentaram níveis semelhantes de congelamento frente ao Contexto A (pré-

tratamento: $F_{2,44} = 0,23$; $P = 0,79$; tratamento: $F_{1,44} = 0,27$; $P = 0,60$; re-exposição ao mesmo contexto: $F_{1,44} = 0,54$; $P = 0,20$, indicando que o nível máximo de congelamento foi alcançado. Durante o Teste B, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do pré-tratamento ($F_{2,44} = 17,9$; $P = 0,000002$) e tratamento ($F_{1,44} = 44,4$; $P = 0,0000001$), bem como uma interação entre esses fatores ($F_{2,44} = 15,6$; $P = 0,00001$). A ioimbina aumentou a expressão de congelamento nos animais pré-tratados com veículo ou prazosin quando comparado aos respectivos controles durante o Teste B (Fig. 19). O pré-tratamento com propranolol preveniu esse efeito quando comparado ao respectivo controle ou ao grupo veículo-ioimbina. Dessa forma, embora a consolidação e reconsolidação apresentem um perfil diferencial de recrutamento de receptores adrenérgicos para a potencialização de uma memória de medo de carácter normal, a indução da memória inapropriada e generalização do medo parecem ser exclusivamente consequência da ativação de receptores β -adrenérgicos em qualquer uma dessas etapas de estabilização.

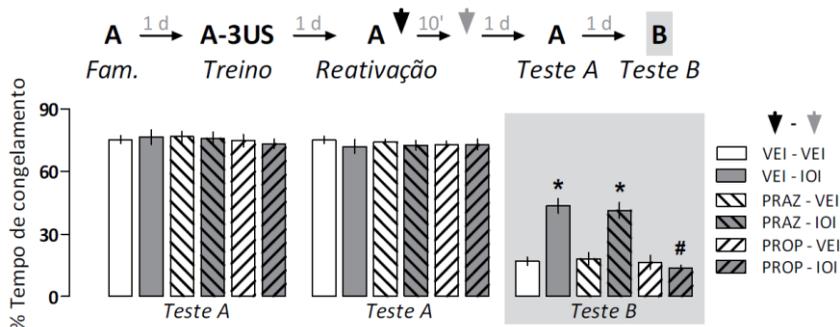


Figura 19. A generalização do medo induzida pela ioimbina durante a reconsolidação de uma memória intensa requer a ativação de receptores β -adrenérgicos. Veículo (VEI), o antagonista α_1 prazosin (PRAZ; 0,5 mg/kg) ou o antagonista β propranolol (PROP; 10 mg/kg) foram administrados por via sistêmica (i.p.) logo após a sessão de reativação da memória de medo contextual, seguido, 10 min após, pela administração de veículo ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg). As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Reativação e Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo grupo controle e # indica uma diferença significativa em relação ao grupo VEI-IOI (ANOVA de duas vias com ou sem repetição seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

2.5 DISCUSSÃO

2.5.1 A modulação noradrenérgica sobre as etapas de estabilização de memórias aversivas normais

O protocolo de treino fraco induziu níveis baixos de respostas defensivas, uma condição adequada quando se busca maximizar a possibilidade de facilitar a formação de uma memória através de manipulações farmacológicas e/ou comportamentais, como descrito por outros grupos de pesquisa (MALDONADO, MARTIJENA, MOLINA, 2011). A administração de ioimbina após o pareamento de um choque com o Contexto A aumentou a expressão de congelamento durante a re-exposição a esse contexto por até uma semana, indicando um efeito facilitatório sobre a consolidação da memória. Em acordo com esse resultado, outros estudos demonstraram que o estresse de imobilização, um procedimento que induz o aumento na liberação de noradrenalina no cérebro de ratos (TANAKA *et al.*, 1982), potencializa a formação da memória de medo contextual (MALDONADO, MARTIJENA, MOLINA, 2011). A aplicação de choques elétricos, por si só, já é suficiente para aumentar a liberação de noradrenalina no cérebro (GOLD, WELSH, 1987), reforçando a participação dessa via na formação das memórias aversivas. Nesse sentido, a administração de adrenalina, que facilita a transmissão noradrenérgica central por mecanismos periféricos (GOLD, VAN BUSKIRK, 1978; CHEN, WILLIAMS, 2012; GOLD, 2014), também potencializa a consolidação de memórias emocionais em roedores (GOLD, VAN BUSKIRK, 1975; GOLD, VAN BUSKIRK, HAYCOCK, 1977) e humanos (CAHILL, ALKIRE, 2003). De maneira importante, a administração sistêmica de ioimbina ou adrenalina facilitam a indução e manutenção da LTP no hipocampo (GOLD, DELANOY, MERRIN, 1984; MONDACA *et al.*, 2004; KOROL, GOLD, 2008). Como os eventos plásticos são modulados positivamente pela atividade noradrenérgica (HARLEY, 1991), pode-se sugerir que o efeito induzido pela ioimbina e adrenalina seja, pelo menos em parte, atribuído a esse mecanismo.

Na dose utilizada, a ioimbina intensificou a expressão de respostas defensivas incondicionadas, como a esQUIVA inibitória avaliada no LCE. Classicamente, a mesma faixa de dose também aumenta as respostas defensivas expressas em outros testes comportamentais (MATTILA, SEPPALA, MATTILA, 1988; ZHENG, RINAMAN, 2013), motivo que faz da ioimbina um agente ansiogênico padrão. Por conta disso, não se pode deixar de pensar que o aumento no congelamento observado durante o Teste A, realizado 24 h após a

administração dessa droga, poderia ser alternativamente interpretado como um efeito ansiogênico prolongado, que causaria um aumento na resposta defensiva frente ao contexto. Contudo, uma vez que concentrações significativas de ioimbina só persistem no cérebro de ratos por até 8 h (HUBBARD *et al.*, 1988), essa é uma possibilidade pouco provável. Além disso, já que a ioimbina não foi capaz de agir como um estímulo incondicionado *per se* na indução da memória de medo contextual nas condições adotadas, é reforçado que o efeito da droga se deve a ação específica na consolidação da memória.

A ioimbina também potencializou a reconsolidação da memória de medo contextual, efeito que não foi observado quando a administração foi realizada imediatamente após a exposição a um contexto neutro, incapaz de induzir a reativação da memória de medo. Esse resultado reforça o papel da transmissão noradrenérgica na reconsolidação das memórias de medo (PRZYBYSLAWSKI, ROULLET, SARA 1999; DEBIEC, BUSH, LEDOUX, 2011). A ioimbina também potencializa a extinção de memórias de medo (CAIN, BLOUIN, BARAD, 2004; MORRIS, BOUTON, 2007). No entanto, enquanto a reconsolidação do traço de memória sob o efeito da ioimbina aumenta a expressão da resposta defensiva por potencializar a memória original, a potencialização da memória de extinção frente à reativação da memória por períodos mais longos causaria uma atenuação da resposta de medo. Dessa forma, ambos os resultados, mesmo que comportamentalmente opostos, sustentam o papel da transmissão noradrenérgica na potencialização das memórias. Justamente por também facilitar a extinção, a ioimbina tem sido proposta como um adjuvante farmacológico para o processo de terapia de exposição, utilizado em transtornos psiquiátricos associados a memórias aversivas aberrantes (CAIN, MAYNARD, KEHNE, 2012; HOLMES, QUIRK, 2010; FITZGERALD, SEEMANN, MAREN, 2014; HOFMANN, FANG, GUTNER, 2014; MCGUIRE, LEWIN, STORCH, 2014; MILAD, ROSENBAUM, SIMON, 2014), motivo pelo qual ela vem sendo testada em humanos em estudos controlados (POWERS *et al.*, 2009; MEYERBROEKER *et al.*, 2012; SMITS *et al.*, 2014). Contudo, com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que o uso da ioimbina deveria ser realizado com cautela – ou até mesmo reconsiderado – já que pequenas variações no protocolo de reativação da memória poderiam levar à facilitação da reconsolidação e aumento do medo ao invés de potencializar a sua extinção.

Embora a consolidação e reconsolidação sejam processos distintos, a susceptibilidade de ambos a modulações noradrenérgicas

parece ser bastante restrita a uma janela temporal estreita (ROULLET, SARA, 1998; TRONEL, FEENSTRA, SARA, 2004). De fato, o efeito da ioimbina sobre a consolidação e reconsolidação não foi observado quando a administração foi realizada 6 h depois da sessão de treino ou de reativação da memória, respectivamente. Esses resultados indicam que o efeito dessa droga é específico sobre as etapas de estabilização. Adicionalmente, como não houve alterações no congelamento durante o Teste A, realizado 18 h após o tratamento com a droga (6 h após o treino; **Tab. 3**), também se descarta a possibilidade de que um efeito ansiogênico residual pudesse justificar o aumento observado nas respostas defensivas.

De maneira oposta à ioimbina, a ativação de receptores α_2 -adrenérgicos com clonidina prejudicou a consolidação e reconsolidação de uma memória de medo contextual de maneira dependente da dose. O efeito amnésico da clonidina é descrito na literatura (GOZZANI, IZQUIERDO, 1976; GALEOTTI, BARTOLINI, GHELARDINI, 2004; GAMACHE, PITMAN, NADER, 2012), provavelmente relacionado à sua capacidade de reduzir a estimulação do *locus coeruleus*, a atividade noradrenérgica central e a indução/manutenção da LTP (ABERCROMBIE, KELLER, ZIGMOND, 1988; RASMUSSEN, JACOBS, 1988; DEBOCK *et al.*, 2003; MONDACA *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2013b). A ação dessa droga não pode ser atribuída a efeitos antiaversivos ou locomotores residuais, já que nenhuma alteração foi observada no LCE. Além disso, mesmo que a clonidina apresentasse efeito sedativo na dose utilizada, as alterações observadas no congelamento não poderiam ser associadas a isso, já que a sedação causaria aumento na imobilidade, e não a redução, como demonstrado. De maneira geral, esses resultados reforçam a ideia de que o efeito facilitatório induzido pela ioimbina nas etapas de processamento da memória avaliadas se deu pelo antagonismo de receptores α_2 -adrenérgicos.

Além da ação da ioimbina sobre os receptores α_2 -adrenérgicos, alguns outros efeitos são descritos pela sua ação em receptores de outras vias de transmissão monoaminérgica, como receptores dopaminérgicos do tipo D₂ ou serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} (HOLMES, QUIRK, 2010). Alguns efeitos da ioimbina sobre a memória, inclusive, parecem ser mediados por outras ações que não pela modulação de receptores α_2 -adrenérgicos (DAVIS *et al.*, 2008). Caso os efeitos observados no protocolo adotado fossem derivados da ação da ioimbina em receptores α_2 , com consequente aumento na liberação de noradrenalina no cérebro, seria esperado o recrutamento de receptores adrenérgicos pós-sinápticos,

como os do tipo α_1 e β , mediando os seus efeitos finais sobre a memória. De fato, o efeito da ioimbina sobre a consolidação foi prevenido pelo antagonismo de receptores β -adrenérgicos centrais com propranolol. Esse resultado é consistente com estudos que demonstram que a consolidação da memória pode ser modulada pela ativação desses receptores no cérebro (SARA, ROULLET, PRZYBYSLAWSKI, 1999), particularmente no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal (TRONEL, FEENSTRA, SARA, 2004; FURINI *et al.*, 2010; GUZMÁN-RAMOS *et al.*, 2012). De maneira análoga, apenas o propranolol preveniu o aumento na resposta defensiva frente ao contexto neutro induzido pela ioimbina (*i.e.*, a generalização do medo), um resultado que condiz com o observado em humanos (SOETER, KINDT, 2012), sugerindo um papel importante dos receptores β -adrenérgicos nesse tipo de resposta inapropriada. Classicamente, a ativação desses receptores facilita a formação das memórias por induzir a síntese proteica necessária para as alterações plásticas necessárias para a consolidação (GELINAS, NGUYEN, 2005; LEMON *et al.*, 2009; O'DELL *et al.*, 2010; MONCADA *et al.*, 2011; HAGENA, MANAHAN-VAUGHAN, 2012; HANSEN, MANAHAN-VAUGHAN, 2014). Como a reconsolidação também depende da síntese proteica (NADER, SCHAFE, LEDOUX, 2000a), a participação dos receptores β -adrenérgicos centrais nessa fase de memória também seria esperada, como demonstrada em outros estudos (PRZYBYSLAWSKI, ROULLET, SARA, 1999; MILTON, LEE, EVERITT, 2008). No presente trabalho, o propranolol preveniu o efeito da ioimbina sobre a reconsolidação, confirmando a participação central desses receptores nesse caso. Já o nadolol foi incapaz de prevenir o efeito da ioimbina nas duas etapas de estabilização, reforçando a ideia de que existe pouca contribuição de receptores β -adrenérgicos periféricos na promoção dos efeitos induzidos pela ioimbina. De maneira importante, a mesma dose de nadolol utilizada foi eficiente em prevenir os efeitos da adrenalina sobre ambas as etapas de estabilização da memória, confirmando o seu mecanismo de ação via ativação de receptores β -adrenérgicos periféricos (CHEN, WILLIAMS, 2012) e comprovando a eficácia dessa dose do antagonista em prevenir efeitos periféricos nas nossas condições experimentais.

O efeito da ioimbina sobre a reconsolidação foi prevenido pelo prazosin, um antagonista seletivo de receptores α_1 -adrenérgicos, resultado que se alinha com evidências do envolvimento desses receptores na reconsolidação da memória do condicionamento de preferência induzido pela cocaína (BERNARDI, LATTAL, 2010) ou do condicionamento olfatório (DO-MONTE *et al.*, 2013). Contudo, o

antagonismo de receptores α_1 -adrenérgicos foi incapaz de prevenir o efeito da ioimbina sobre a consolidação da memória de medo contextual. Mesmo que apenas uma dose de prazosin tenha sido utilizada, é importante ressaltar que a mesma dose foi suficiente para prevenir o efeito da ioimbina sobre a reconsolidação. Isso demonstra, pela primeira vez, que as diferenças mecânicas entre a consolidação e reconsolidação das memórias se estendem ao recrutamento de receptores adrenérgicos. Como tanto os receptores α_1 - e β -adrenérgicos são expressos em regiões cerebrais interconectadas e relacionadas ao aprendizado e memória (RAINBOW, BIEGON, 1983; SUMMERS *et al.*, 1995; NICHOLAS, HÖKFELT, PIERIBONE, 1996; HILLMAN *et al.*, 2005), o recrutamento dessas regiões poderia ser responsável pelo efeito observado sobre a memória. Além do fato dessas regiões cerebrais receberem aferentes heterogêneos do *locus coeruleus* (*i.e.*, não serem expostas às mesmas concentrações de noradrenalina; VAN VELDHUIZEN, FEENSTRA, BOER, 1994), o recrutamento delas também parece ser diferencial durante a consolidação e reconsolidação de um mesmo tipo de memória (TAUBENFELDT *et al.*, 2001; GARCIA-DELATORRE *et al.*, 2010). O córtex pré-frontal, por exemplo, pode estar envolvido de maneira divergente durante essas etapas de estabilização de acordo com o nível de alerta/estresse induzido pela tarefa a ser executada (MAROUN, AKIRAV, 2009). De maneira consonante, a expressão de receptores α_1 -adrenérgicos parece ser muito maior no córtex pré-frontal em comparação ao hipocampo e amígdala (RAINBOW, BIEGON, 1983; NICHOLAS, HÖKFELT, PIERIBONE, 1996). Embora a participação do córtex pré-frontal no condicionamento de medo contextual seja descrita (STERN *et al.*, 2014), o envolvimento de receptores α_1 -adrenérgicos nessa estrutura ainda não é bem estabelecido para esse tipo de memória.

Como um todo, pode-se sugerir que a facilitação induzida pela ioimbina na consolidação e reconsolidação da memória de medo contextual de caráter adaptativo recruta um padrão ligeiramente diferente de ativação de subtipos de receptores adrenérgicos que pode refletir uma diferença nas suas expressões relativas em diferentes estruturas do cérebro. Adicionalmente, como os efeitos da ioimbina são prevenidos com o uso de antagonistas seletivos de receptores α_1 e β -adrenérgicos, pode-se assumir que seu efeito é, de maneira geral, relacionado a um aumento no tônus noradrenérgico central. Por conta disso, de agora em diante, a administração de ioimbina e consequente potencialização (*i.e.*, hiperativação) do sistema noradrenérgico serão

termos intercambiáveis e utilizados de maneira subentendida ao longo do texto.

2.5.2 A modulação noradrenérgica na formação de memórias inapropriadas

O tratamento sequencial com ioimbina durante a consolidação e reconsolidação da memória permitiu que um nível máximo do comportamento de congelamento fosse alcançado frente ao contexto pareado, com a generalização dessa resposta de medo mesmo a um contexto neutro. Esse efeito parece resultar de uma interferência “exagerada” no processamento da memória de medo induzida pela hiperativação adrenérgica. A generalização do medo é uma das características claramente evidentes no transtorno do estresse pós-traumático (KLEIM, EHLERS, 2008; JOVANOVIĆ *et al.*, 2009; FLEURKENS, RINCK, VAN MINNEN, 2011; JOVANOVIĆ *et al.*, 2012; KOSTEK *et al.*, 2014; NORRHOLM *et al.*, 2014; LEVY-GIGI *et al.*, 2015), que é associado ao funcionamento anormal e exagerado das vias noradrenérgicas (PITMAN, 1989; YEHUDA, MCFARLANE, SHALEV, 1998; O'DONNELL, HEGADOREN, COUPLAND, 2004). Além disso, pacientes acometidos por esse transtorno também apresentam outras características anormais relacionadas à memória traumática, como um prejuízo no processo de extinção (CAIN, MAYNARD, KEHNE, 2012). Em humanos saudáveis, a hiperativação noradrenérgica induzida pela ioimbina durante a consolidação de uma memória aversiva causa prejuízos na extinção (SOETER, KINDT, 2012), um padrão parecido com o observado em ratos frente à ativação de receptores β -adrenérgicos da amígdala durante a reconsolidação de uma memória de medo (DEBIEC, BUSH, LEDOUX, 2011). Como essa e outras características inapropriadas parecem ser relacionadas à potencialização noradrenérgica das memórias de medo, uma abordagem aprofundada de outras características disfuncionais, além da generalização do medo, será realizada subsequentemente.

A generalização do medo, por si só, é um processo que acontece naturalmente com as memórias contextuais com o passar do tempo. Supostamente, isso resultaria da dinâmica relacionada ao processamento das memórias remotas: ao longo do tempo, aconteceria a redistribuição do engrama de estruturas como o hipocampo para outras regiões corticais (WILTGEN, SILVA, 2007). Como o hipocampo é especializado no processamento contextual e possui uma densidade alta de neurônios envolvidos com o processamento espacial, seu

envolvimento mais proeminente na sustentação de memórias recentes garante a especificidade de seu conteúdo (MIZUMORI *et al.*, 1999; KNIERIM, LEE, HARGREAVES, 2006). Ao passo que o hipocampo se torna menos envolvido com a manutenção das memórias remotas, é natural imaginar que muito da especificidade original se perca, aumentando o grau de generalização ao longo do tempo (DUDAI, 2004). Obviamente, essa é apenas uma das teorias correntes para explicar a generalização das memórias dependente do tempo. Mesmo que certo grau de perda de especificidade aconteça naturalmente, interferências agudas que induzam essa característica, a curto prazo, devem ser interpretadas de uma maneira diferenciada, já que elas se aproximariam muito mais de um processamento inapropriado e disfuncional das memórias de medo. A indução dessa característica nas nossas condições poderia fornecer informações importantes sobre o processamento das memórias de medo inapropriadas, como as envolvidas em transtornos psiquiátricos (PITMAN, 1989). Por conta disso, mesmo que tenha sido observado um aumento na expressão do comportamento de medo frente ao contexto neutro durante os Testes B₁ e B₂ em alguns casos, pouca atenção foi dada nessas situações quando o aumento acontecia tanto no grupo tratado quanto controle, já que ele possivelmente se relacionaria ao aumento esperado na expressão do medo ao longo do tempo.

A administração consecutiva de ioimbina em sessões distintas de reativação da memória aumentou cumulativamente o congelamento frente ao contexto pareado. Esse resultado reforça a premissa de que uma memória aversiva constantemente reprocessada em condições de tônus noradrenérgico elevado poderia ser gradualmente potencializada e tornar-se persistente, uma das hipóteses sugeridas para a gênese e manutenção das memórias traumáticas (DEBIEC, 2012). No entanto, como a generalização do medo não foi observada nessa situação, poderia surgir o argumento de que essa característica inapropriada resultaria exclusivamente da potencialização da consolidação da memória. Como a administração de ioimbina em uma terceira reativação da memória (*i.e.*, após atingir um nível máximo possível do comportamento condicionado) causou um perfil evidente de generalização do medo, essa alteração comportamental parece não ser associada a diferenças qualitativas entre consolidação e reconsolidação. Ao invés disso, a generalização do medo parece ser quantitativamente relacionada ao processo de condicionamento de medo e consequente expressão de congelamento. Quando o comportamento de congelamento alcança níveis máximos frente ao contexto pareado aos choques,

assumindo um padrão assintótico, qualquer potencialização noradrenérgica subsequente – seja na consolidação ou reconsolidação da memória de medo – resultaria na incapacidade de restringir as reações de medo ao contexto apropriado, na denominada “teoria assintótica da generalização do medo”, como proposta com base nesses resultados (Fig. 20). A natureza quantitativa do perfil necessário para a indução dessa característica inapropriada é sustentada por evidências de outros estudos que demonstram que a generalização do medo frente a pistas contextuais e sonoras só é induzida após a potencialização da memória de medo que induz a expressão de níveis máximos de congelamento (KAOUANE *et al.*, 2012).

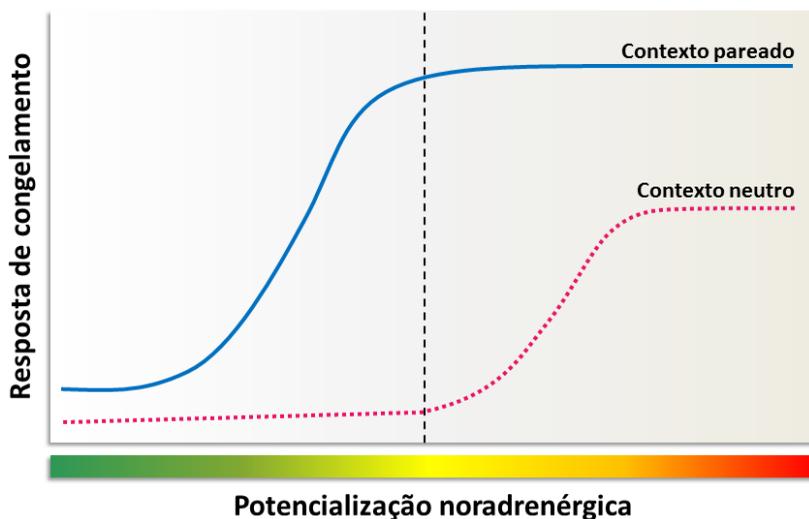


Figura 20. A teoria assintótica da generalização do medo. Em situações em que o comportamento de congelamento alcança níveis “teto” frente ao contexto pareado, seja por meio do uso de um treino forte ou potencialização prévia da memória, a estimulação noradrenérgica subsequente seria suficiente para induzir generalização do medo.

Indo ao encontro da teoria assintótica da generalização do medo, quando um protocolo de condicionamento contextual de medo com treino forte foi utilizado, uma única injeção de ioimbina, seja na consolidação ou reconsolidação da memória, bastou para induzir generalização do medo. Em ambos os casos, apenas o propranolol foi capaz de prevenir essa alteração comportamental inapropriada. Esse resultado é intrigante quando se leva em conta as diferenças quanto ao

recrutamento de receptores adrenérgicos nessas duas etapas de estabilização de uma memória aversiva normal. De alguma forma, mesmo havendo essas divergências que ressaltam as diferenças entre as duas etapas, o mecanismo de indução da generalização do medo parece convergir para a ativação de receptores β -adrenérgicos. Novamente, vale lembrar que apenas uma dose de prazosin foi utilizada; como a utilização de um treino mais intenso pode acarretar em uma liberação mais acentuada de noradrenalina no cérebro (GOLD, VAN BUSKIRK, 1978; TSUDA *et al.*, 1986; NATELSON *et al.*, 1987), uma dose maior do antagonista poderia ser necessária para evitar o seu deslocamento pela competição com o transmissor, disponível em concentrações maiores. Alternativamente, o uso de antagonistas mais potentes e seletivos para receptores α_1 -adrenérgicos – que, conseqüentemente, necessitariam de doses menores para antagonizar esses receptores com um risco reduzido de produzir efeitos inespecíficos – ajudaria a esclarecer esse aspecto. Dessa forma, mesmo que as evidências apontem para um recrutamento preferencial de receptores β -adrenérgicos no desenvolvimento da generalização do medo, não se deve descartar a participação de outros receptores noradrenérgicos sem alguma cautela. Atualmente, poucos são os estudos que direcionam a atenção para o surgimento dessa resposta disfuncional e, quando o fazem, esforços maiores são direcionados à caracterização das respostas comportamentais, e não ao entendimento dos mecanismos neurobiológicos e farmacológicos relacionados à sua indução, o que torna o conhecimento bastante escasso nesse sentido.

Um resultado inesperado foi que tanto o propranolol quanto o prazosin, em doses relativamente elevadas e capazes de prejudicar etapas do processamento da memória em outras condições (DO-MONTE, ALLENSWORTH, CAROBREZ, 2010; DO-MONTE *et al.*, 2010; 2013), não prejudicaram a consolidação e/ou reconsolidação da memória de medo contextual. Embora muitos estudos pré-clínicos apontem para o uso em potencial desses agentes no controle de memórias disfuncionais (DEBIEC, LEDOUX, 2004; BERNARDI, LATTAL, BERGER, 2006; FRICKS-GLEASON, MARSHALL, 2008; ROBINSON, ARMSON, FRANKLIN, 2011; VETERE *et al.*, 2013), os resultados são mistos e discrepantes (COHEN *et al.*, 2011; FONT, CUNNINGHAM, 2012; TAHERIAN *et al.*, 2014), sugerindo uma eficácia limitada desses agentes (MURAVIEVA, ALBERINI, 2010), mesmo de uma maneira translacional. Em humanos, essas divergências também podem ser observadas com o uso de antagonistas de receptores β -adrenérgicos durante as etapas de estabilização da memória

(O'CARROLL *et al.*, 1999a; STEIN *et al.*, 2007; DONOVAN 2010; SCHWABE *et al.*, 2012; LONERGAN *et al.*, 2013; BRUNET *et al.*, 2014; SPRING *et al.*, 2014). Dentre as teorias para explicar essas divergências, talvez a mais interessante aborda a possibilidade de mecanismos de transdução redundantes frente à ativação catecolaminérgica. Os sistemas noradrenérgico e dopaminérgico, por exemplo, apresentam convergências que se estendem desde a via de síntese dos transmissores por uma rota comum até à similaridade entre os receptores, havendo, mesmo que de maneira sutil, uma certa atividade cruzada entre esses sistemas (ZHANG, OUYANG, THOMAS, 2004). Foi demonstrado que, ao menos para a consolidação da memória, a ativação de receptores β_2 -adrenérgicos e dopaminérgicos do tipo D₅ na amígdala ativam uma mesma via de transdução de sinal intracelular (*i.e.*, uma via “redundante”) recrutada para a codificação do engrama (OUYANG *et al.*, 2012). Frente a estímulos de alta intensidade – como o treino forte adotado neste trabalho – haveria um aumento fásico e de alta magnitude na liberação de catecolaminas, que levaria à formação da memória, facilitando o seu estabelecimento. Portanto, mesmo que uma dessas vias de transmissão seja bloqueada com antagonistas seletivos, a potencialização da memória ainda seria evidente, já que a via de transdução de sinal redundante seria recrutada através da ativação de receptores da outra via catecolaminérgica. Dessa forma, o antagonismo isolado de receptores adrenérgicos (ou a omissão da expressão desses receptores por manipulação genética) não seria suficiente para atenuar uma memória intensa, sendo necessário, nesse caso, o bloqueio de ambos os sistemas. Ao contrário disso, a potencialização isolada de cada um desses sistemas bastaria para fortalecer memórias de menores intensidades (OUYANG *et al.*, 2012). Talvez por isso tenha sido possível, nesse trabalho, bloquear os efeitos facilitatórios induzidos pela ioimbina, que potencializa a transmissão noradrenérgica de uma maneira mais pontual, sem qualquer efeito dos antagonistas adrenérgicos, por si só, nas memórias aversivas de maior intensidade.

2.6 CONCLUSÕES

A hiperativação noradrenérgica induzida pela administração sistêmica de ioimbina permite que um traço de memória de medo contextual seja consolidado e reconsolidado de uma maneira mais intensa e duradoura, com aumentos expressivos na resposta de medo frente ao contexto pareado, um efeito oposto daqueles obtidos com a administração de clonidina. Em uma memória de caráter normal, a

potencialização noradrenérgica dessas duas etapas depende do recrutamento diferencial dos receptores α_1 - e β -adrenérgicos no cérebro, implicando, pela primeira vez, que a natureza distinta entre esses processos de estabilização da memória abrange até mesmo o perfil de ativação de receptores noradrenérgicos.

A administração sequencial de ioimbina durante a consolidação e/ou reconsolidação de uma memória normal permite o seu fortalecimento até alcançar níveis inapropriados, apresentando generalização do medo. A capacidade em induzir essa memória disfuncional é diretamente relacionada à intensidade da memória de medo, sendo somente induzida em situações em que os comportamentos defensivos já alcançaram um patamar máximo frente ao contexto pareado. Embora a generalização possa ser induzida tanto por interferências noradrenérgicas sobre a consolidação ou reconsolidação de uma memória intensa, o desenvolvimento dessa característica parece depender exclusivamente da ativação de receptores β -adrenérgicos, ao contrário do observado anteriormente em memórias fisiológicas.

3

Modelando memórias inapropriadas com a hiperativação noradrenérgica

“A utilidade de todas as paixões consiste em fortalecer e fazer durar na alma pensamentos que são bons que ela conserve, assim como todo o mal que podem causar consiste em fortalecer e conservar esses pensamentos mais do que o necessário.”

— René Descartes

3.1 INTRODUÇÃO

O transtorno do estresse pós-traumático (PTSD, do inglês ‘*post-traumatic stress disorder*’) se desenvolve em uma parcela das pessoas expostas a um evento traumático de grande severidade, havendo a formação de uma memória disfuncional (PITMAN, 1989; BRACHA, 2006). Os pacientes acometidos expressam formas inadequadas de respostas de ansiedade e medo não somente frente a pistas associadas ao evento traumático, mas mesmo em situações que não oferecem risco ou sem relação com esse evento, caracterizando generalização do medo (JOVANOVIĆ *et al.*, 2012; NORRHOLM *et al.*, 2014). Além disso, os pacientes são frequentemente perturbados por evocações espontâneas relacionadas ao trauma (memórias intrusivas ou ‘*flashbacks*’), características que parecem se relacionar à intensidade com a qual a memória do evento traumático foi codificada (EHLERS, HACKMANN, MICHAEL, 2004). Como a hiperatividade noradrenérgica é observada nesses pacientes em diversos momentos (SOUTHWICK *et al.*, 1999; O'DONNELL, HEGADOREN, COUPLAND, 2004; KRYSTAL, NEUMEISTER, 2009), a modulação dessa via na formação da memória traumática é considerada um dos possíveis mecanismos para o desenvolvimento desse transtorno.

3.1.1 Disfunção noradrenérgica no PTSD

Embora não se possa afirmar se a hiperativação noradrenérgica é uma consequência ou um fator de risco para o surgimento do PTSD (YEHUDA, LEDOUX, 2007), certos estudos apontam a sua importância para a instalação desse transtorno: pacientes que apresentaram alterações autonômicas simpáticas diretamente relacionadas a uma hiperatividade simpática logo após a ocorrência de um evento traumático, um momento crítico para a consolidação da memória aversiva, tiveram maior probabilidade de desenvolver essa doença (SHALEV *et al.*, 1998; YEHUDA, MCFARLANE, SHALEV, 1998). Várias alterações que poderiam justificar a hiperativação noradrenérgica vêm sendo descritas nesses pacientes. Por exemplo, uma menor atividade das enzimas que degradam catecolaminas poderia contribuir com o aumento no tônus noradrenérgico (NORRHOLM *et al.*, 2013), existindo, inclusive, uma correlação entre os níveis centrais de ativação noradrenérgica e a severidade de sintomas (GERACIOTI *et al.*, 2001). Após a lembrança do evento traumático são observados aumentos significativos nas concentrações de metabólitos de catecolaminas na urina e concentrações

elevadas de noradrenalina no fluido cerebrospinal (GERACIOTI *et al.*, 2008), indicando que o aumento no tônus simpático pode derivar de uma hiper-reatividade do sistema, indicando um papel importante de alterações no sistema de autocontrole sobre a liberação da noradrenalina.

De fato, há uma redução no controle inibitório mediado pelos receptores α_2 -adrenérgicos em plaquetas de pacientes com PTSD (PERRY, GILLER, SOUTHWICK, 1987). Sabe-se que variações nos genes que codificam alguns subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos são mais prevalentes nesses pacientes, além de facilitarem a formação de memórias aversivas em roedores (DE QUERVAIN *et al.*, 2007). Adicionalmente, humanos saudáveis que possuem essa variante genética tem um recrutamento mais proeminente de estruturas encefálicas envolvidas no processamento das memórias emocionais (RASCH *et al.*, 2009; COUSIJN *et al.*, 2010). Como consequência de alterações na atividade ou eficiência desses receptores, há uma redução no tônus inibitório que exercem e aumento na liberação de noradrenalina no cérebro (LIBERZON *et al.*, 1999). Em acordo com esses estudos, grande parte dos pacientes com PTSD apresenta ataques de pânico, ocorrência de memórias intrusivas e aumento na atividade autonômica simpática após a administração de ioimbina (SOUTHWICK *et al.*, 1993; MORGAN *et al.*, 1995). Além de reforçar a participação do sistema noradrenérgico na fisiopatologia desse transtorno, esses dados ligam a hiper-reatividade noradrenérgica a possíveis alterações nos receptores α_2 -adrenérgicos.

Uma das teorias propostas para explicar a ocorrência do PTSD seria a consolidação exagerada da memória de medo ('*overconsolidation*' ou superconsolidação), permitindo a instalação de uma forma inadequada dessa memória, mais persistente e menos susceptível à extinção (PITMAN, 1989; BRACHA, 2006). Uma causa provável para isso seria o desajuste em sistemas neuroendócrinos envolvidos no controle das respostas de estresse observados no PTSD, como o descrito no sistema noradrenérgico (SOUTHWICK *et al.*, 1999; O'DONNELL, HEGADOREN, COUPLAND, 2004; KRYSTAL, NEUMEISTER, 2009). Embora alterações em outros sistemas, como o glicocorticoide e endocanabinoide, também possam ser relacionadas ao desenvolvimento e manutenção do transtorno (YEHUDA *et al.*, 2013; ZOLADZ, DIAMOND, 2013), acredita-se que a via final dependa do recrutamento de vias noradrenérgicas (PITMAN, 1989), sendo que esse sistema talvez represente uma figura central na tríade de interação noradrenérgica-endocanabinoide-glicocorticoide proposta para a fisiopatologia do PTSD. Por conta disso, alterações noradrenérgicas são

até mesmo consideradas como biomarcadores para essa doença (KIBLER *et al.*, 2014). No entanto, a premissa de que a superconsolidação de uma memória – especialmente dependente do sistema noradrenérgico – levaria ao desenvolvimento de características anormais comuns ao PTSD é pouco visada no contexto pré-clínico.

Em vista da participação noradrenérgica no desenvolvimento do PTSD, agentes adrenérgicos são frequentemente investigados como alvos terapêuticos em potencial (STRAWN, GERACIOTI, 2008; LIPOV, KELZENBERG, 2012). Antagonistas de receptores β -adrenérgicos, por exemplo, teriam a vantagem de reduzir tanto os sintomas somáticos quanto os psicológicos (GILES, 2005; TOLLENAAR *et al.*, 2009; DONOVAN, 2010). Mais recentemente, os efeitos do uso de antagonistas α_1 -adrenérgicos também vêm sendo investigados (DE JONG *et al.*, 2010; SALVIATI *et al.*, 2013; WRITER, MEYER, SCHILLERSTROM, 2014). Mas além do tratamento paliativo, uma das estratégias sob investigação seriam métodos para desacoplar, atenuar ou mesmo “apagar” a valência negativa associada à memória traumática que mantém o PTSD (CAIN, MAYNARD, KEHNE, 2012; DEBIEC, 2012; STECKLER, RISBROUGH, 2012; PARSONS, RESSLER, 2013), por meio de interferências na etapa de reconsolidação (DIERGAARDE, SCHOFFELMEER, DE VRIES, 2008; PITMAN, 2011). Nesse sentido, várias drogas são capazes de prejudicar a reconsolidação de memórias de medo condicionado de maneira duradoura em animais de laboratório (PRZYBYSLAWSKI, ROULLET, SARA, 1999; BUSTOS *et al.*, 2010; GAMACHE, PITMAN, NADER, 2012; STERN *et al.*, 2012) e humanos saudáveis (SCHWABE *et al.*, 2012; BRUNET *et al.*, 2014). Contudo, mesmo que esses agentes apresentem perfis interessantes em condições pré-clínicas, muitas vezes não há a translação desses resultados para a clínica (NESTLER, HYMAN, 2010; TOTH, CICCHETTI, 2011; COHEN, MATAR, ZOHAR, 2014; DASKALAKIS, YEHUDA, DIAMOND, 2013). Considerando que as memórias inapropriadas parecem ser menos sensíveis a intervenções (SOETER, KINDT, 2013), a falta de protocolos experimentais simples que possam modelar o perfil de alterações relacionadas às memórias disfuncionais do PTSD de uma maneira mais completa acaba atrasando os avanços com potencial translacional.

3.1.2 O desafio de modelar memórias traumáticas: o abismo entre o fisiológico e o disfuncional

Embora o PTSD seja uma doença complexa, testes comportamentais e modelos animais podem auxiliar no entendimento da dinâmica e neurobiologia das memórias aversivas, como o caso dos protocolos de condicionamento de medo (MAREN, PHAN, LIBERZON, 2013; BRISCIONE, JOVANOVIC, NORRHOLM, 2014). No entanto, um obstáculo à extrapolação de resultados obtidos em roedores à condição clínica é que, na maioria dos casos, as memórias aversivas modeladas em condições experimentais abrangem tão e somente aquelas compreendidas na faixa fisiológica e adaptativa do aprendizado, que não necessariamente teriam uma relação direta com as memórias traumáticas envolvidas no PTSD. A memória traumática desses pacientes, por sua vez, se estende a aspectos patológicos e aberrantes, como a generalização do medo frente a situações que não remetam ao trauma, resistência da memória traumática a estratégias para a redução da sua magnitude (*i.e.*, indução da extinção ou o uso de agentes amnésicos), entre outros (FANSELOW, PONNUSAMY, 2008; NESTLER; HYMAN, 2010). Essas características não são observadas rotineiramente em testes comportamentais, o que inviabiliza – além de tornar simplista – a visão de que eles possam constituir “modelos de PTSD” (YEHUDA, ANTELMAN, 1993; SIEGMUND, WOTJAK, 2006).

Mesmo que alguns agentes estressores, como a imobilização (MALDONADO, MARTIJENA, MOLINA, 2011), confronto com predadores (CORLEY, CARUSO, TAKAHASHI, 2011) ou “lembretes” sequenciais de eventos aversivos (OLSON *et al.*, 2011), possam ser utilizados para potencializar o condicionamento aversivo e simular algumas características de memórias patológicas, existe uma busca constante por novas formas de modelar memórias aversivas que se afastariam ao máximo da faixa adaptativa (MILLER, MCEWEN, 2006; COHEN, RICHTER-LEVIN, 2009; PITMAN *et al.*, 2012). Uma alternativa para modelar esse tipo de memória é a simulação de características fisiopatológicas do PTSD – como as alterações neuroendócrinas – que podem ser relacionadas com a superconsolidação da memória traumática e surgimento de características inapropriadas (FANSELOW, PONNUSAMY, 2008; PITMAN *et al.*, 2012; DASKALAKIS, YEHUDA, DIAMOND, 2013). Ferramentas farmacológicas que simulam a hiper-reatividade noradrenérgica, por exemplo, poderiam oferecer vantagens quanto ao modelamento de

memórias tipo-PTSD: as alterações em receptores α_2 -adrenérgicos descritas nesses pacientes, associadas ao perfil de simulação da hiperatividade noradrenérgica induzido pela ioimbina fazem dessa droga uma boa escolha no modelamento de memórias inapropriadas em condições pré-clínicas. Experimentos apresentados no capítulo anterior mostraram que a administração da ioimbina em momentos críticos para a consolidação de uma memória de medo contextual de alta intensidade – “mimetizando” o que é observado na clínica – causou generalização do medo. Esse resultado indica que, nessas condições, poderia haver a indução de outras características disfuncionais, permitindo refinar o modelamento de memórias de medo inapropriadas.

3.2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

Levando em conta a importância fisiopatológica da hiperativação noradrenérgica no estabelecimento da memória traumática no PTSD, a hipótese dessa etapa do trabalho é que a potencialização do sistema noradrenérgico durante a consolidação de uma memória de medo contextual intensa modelaria características comportamentais inapropriadas associadas a uma memória patológica, com relevância translacional para a pesquisa pré-clínica a ponto de permitir uma busca mais eficiente por intervenções com potencial terapêutico.

3.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral foi avaliar a capacidade da potencialização da consolidação da memória induzida pela ioimbina em gerar comportamentos e características inapropriadas.

3.2.1.1 Objetivos específicos

- Caracterizar o efeito da ioimbina sobre a etapa de consolidação na indução da generalização do medo;
- Avaliar a duração do perfil de generalização do medo induzido pela ioimbina;
- Investigar a ocorrência de prejuízos na extinção da memória de medo inapropriada modelada com a ioimbina;
- Avaliar a resistência ao efeito antiaversivo do midazolam frente às respostas defensivas decorrentes da memória inapropriada;
- Avaliar a susceptibilidade de labilização da memória exagerada frente à sua reativação e possibilidade de prejudicar a sua

reconsolidação com agentes amnésicos efetivos para memórias normais;

- Determinar a contribuição de receptores β -adrenérgicos localizados no sistema nervoso central e na periferia para a geração da memória de medo inapropriada;
- Avaliar alterações cardiovasculares associadas à memória inapropriada;
- Verificar a ocorrência de sensibilização das respostas defensivas em decorrência da formação da memória inapropriada.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Animais

Foram utilizados 464 ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, com 3 a 4 meses de idade e peso entre 270 e 350 g. Os animais foram mantidos em condições idênticas às descritas anteriormente (seção 2.3.1, pág. 51), com aprovação do comitê de ética para o uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (17/CEUA/PRPE/2011-PP660).

3.3.2 Drogas

Cloridrato de ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg; Tocris, EUA), cloridrato de clonidina (CLO; 0,3 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA), cloridrato de propranolol (PROP; 10 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA), nadolol (NAD; 10 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA), midazolam (MDZ; 0,5 mg/kg; Cristália, Brasil) e D-cicloserina (DCS; 15 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA) foram dissolvidos em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%). Canabidiol (CBD; 10 mg/kg; THC-Pharma, Alemanha) foi dissolvido em solução salina com 5% de Tween 80[®] (Sigma-Aldrich, EUA). Todas as soluções foram administradas sistemicamente (i.p.) em um volume de 1,0 ml/kg.

A seleção das doses dessas drogas foi baseada nos resultados de etapas anteriores. A dose antiaversiva do midazolam foi selecionada com base em estudos no LCE (GAZARINI *et al.*, 2010). A dose de D-cicloserina foi a mesma capaz de facilitar a labilização de memórias emocionais intensas, sem interferir na evocação ou expressão da memória de medo contextual (BUSTOS *et al.*, 2010). A dose de canabidiol capaz de prejudicar a reconsolidação da memória foi

escolhida a partir de um trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa (STERN *et al.*, 2012).

3.3.3 Condicionamento de medo contextual

O condicionamento de medo contextual foi realizado como descrito anteriormente (seção 2.3.3, pág. 52). A maior diferença se deu com relação à sessão de treino: na maioria dos casos, foi utilizado o treino forte, com **três choques elétricos nas patas** (0,7 mA, 60 Hz, por 3 s, com 30 s de intervalo entre os choques). Em algumas situações, os animais passaram pelo treino fraco, com a aplicação de **apenas um choque elétrico nas patas** (de mesma intensidade).

Como experimentos prévios demonstraram que a generalização do medo pode acontecer frente a potencialização da consolidação ou da reconsolidação da memória intensa, e que ambos dependem dos mesmos mecanismos adrenérgicos, a estimulação noradrenérgica foi realizada sempre após a sessão de treino, a fim de simplificar a realização dos experimentos. A re-exposição ao Contexto A (Teste A) e exposição ao Contexto B (Teste B) foram realizadas nos dias subsequentes. Quando o objetivo foi avaliar as interferências sobre a etapa de reconsolidação e/ou expressão da memória, uma sessão de reativação da memória (re-exposição ao Contexto A por 3 min) foi adicionada um dia após a sessão de treino. A extinção da memória foi induzida pela exposição dos animais ao Contexto A por um período mais longo (15 min). De maneira geral, todas as sessões foram espaçadas entre si por um período de 24 h. No entanto, para avaliar a duração e persistência da memória de medo, cada sessão de teste foi repetida 7, 14, 21 e/ou 28 dias após o treino. Variações no protocolo geral, condições controle e detalhes específicos serão apontados durante a descrição dos resultados pertinentes.

Além da porcentagem de tempo de congelamento, foi utilizado o índice de extinção, que representa a porcentagem de redução no comportamento de congelamento entre os primeiros e últimos 3 min da sessão de extinção, que foi calculado pela expressão: $[(\text{tempo de congelamento durante os 3 min iniciais da sessão de extinção} - \text{tempo de congelamento durante os 3 min finais da sessão de extinção}) / \text{tempo de congelamento durante os 3 min iniciais da sessão de extinção}]$.

3.3.4 Labirinto em cruz elevado

O protocolo experimental utilizado foi o mesmo descrito na seção 2.3.4 (pág. 53), com a diferença de que uma lâmpada fluorescente vermelha (14 W) foi utilizada para a iluminação, oferecendo uma

condição menos aversiva (VIOLLE *et al.*, 2009) que otimizasse o protocolo para a detecção de comportamentos tipo-ansiofênicos.

3.3.5 Pletismografia caudal para medida indireta da pressão sistólica

Os animais foram ambientados em uma sala com temperatura controlada ($\sim 28^\circ\text{C}$) por 2 h. Cada rato foi colocado individualmente em uma câmara de contenção e um ocluser (*'tail-cuff'*) foi posicionado na porção proximal da cauda. A fim de obter medidas precisas, os ratos permaneceram imobilizados durante toda a sessão. O ocluser foi inflado até cessar o fluxo sanguíneo local e o sensor integrado detectou o retorno do fluxo a cada ciclo de deflação por meio de um amplificador (ML125/R NIBP Controller, ADInstruments, Austrália) acoplado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab[®] PL3508, ADInstruments, Austrália). Após um período de estabilização na câmara de contenção (5 min), a sessão de testes foi composta por uma média de 3 a 5 repetições do ciclo de inflação/deflação. Os registros foram analisados com o software LabChart[®] 7 (MLS060/7, ADInstruments, Austrália). A média dos valores obtidos foi calculada e utilizada como uma medida única para cada animal.

3.3.6 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Quando os dados não seguiam distribuição normal (sessão de extinção), os valores foram transformados ($1/x$) a fim de assegurar a uniformidade. Os dados foram submetidos à ANOVA de uma ou duas vias. Durante a sessão de extinção (dividida em blocos) ou quando re-exposições ao mesmo contexto foram realizadas, foi adotada a ANOVA de medidas repetidas. Sempre após essas análises, foi utilizado o teste *post-hoc* de Newman-Keuls, com valor de significância estatística de $P < 0,05$, para determinar as diferenças entre os grupos. O teste "t" de Student foi adotado para a comparação de dois grupos independentes, quando necessário. Os resultados foram analisados utilizando o Statistica[®] 7 (StatSoft Inc., EUA) e foram representados em gráficos confeccionados com o GraphPad Prism[®] 5 (GraphPad Prism, EUA). Todos os gráficos são acompanhados por esquemas que indicam o protocolo experimental adotado e momentos da administração de drogas.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 A estimulação noradrenérgica restrita à janela de consolidação induz a generalização do medo

Para confirmar se a generalização do medo induzida pela estimulação noradrenérgica se deve a uma interferência específica na consolidação da memória de medo contextual, 36 ratos foram alocados em 4 grupos ($n=8-10/\text{grupo}$) com base no tratamento sistêmico (veículo ou ioimbina 1,0 mg/kg) e no momento em que ele foi realizado (logo após o à sessão de treino forte ou 6 h após).

A ANOVA de duas vias indicou um efeito do tratamento ($F_{1,32} = 55,2$; $P = 0,0000001$), momento de injeção ($F_{1,32} = 32,9$; $P = 0,000002$) e uma interação significativa entre esses fatores ($F_{1,32} = 46,0$; $P = 0,0000001$) durante o Teste B. Os animais que receberam ioimbina imediatamente após a sessão de treino, mas não 6 h após, apresentaram aumento do tempo de congelamento durante o Teste B (**Fig. 21**), caracterizando generalização do medo. Todos os grupos apresentaram níveis comparáveis de congelamento durante o Teste A (tratamento: $F_{1,32} = 0,41$; $P = 0,52$; momento de injeção: $F_{1,32} = 0,63$; $P = 0,43$), supostamente por alcançar o nível máximo dessa resposta condicionada.

A fim de confirmar que o treino com 3 choques seria suficiente para alcançar níveis máximos de congelamento durante o Teste A, 30 ratos foram alocados em 3 grupos ($n=10/\text{grupo}$), com base no número de choques aplicados durante a sessão de treino (1, 3 ou 5). A ANOVA de uma via indicou um efeito significativo durante o Teste A ($F_{2,27} = 31,8$; $P = 0,0000001$). O grupo que recebeu um único choque apresentou menos congelamento quando comparado aos grupos que receberam 3 ou 5 choques, ao mesmo tempo que nenhuma diferença significativa foi observada entre os últimos grupos (**Tab. 9**), sugerindo que a resposta condicionada atingiu um nível assintótico. Nessas condições, todos os grupos apresentaram níveis comparáveis de congelamento durante a exposição ao Contexto B ($F_{2,27} = 1,7$; $P = 0,20$).

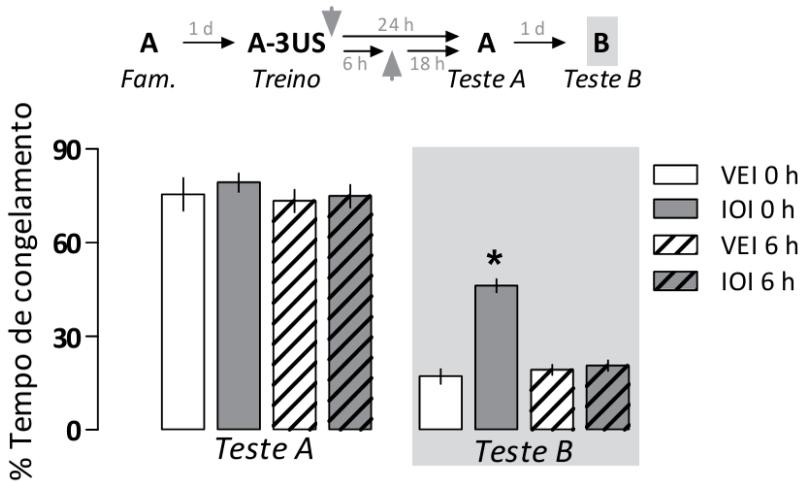


Figura 21. A potencialização noradrenérgica dentro da janela de consolidação causa generalização do medo. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual (0 h) ou 6 h após. As setas indicam o momento do tratamento. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Tabela 9. O treino com 3 choques leva à expressão máxima de congelamento no contexto pareado.

	1 choque (n=10)	3 choques (n=10)	5 choques (n=10)
Teste A	28,3 \pm 5,7*	73,2 \pm 4,5	75,3 \pm 3,7
Teste B	10,2 \pm 3,0	18,5 \pm 2,5	19,3 \pm 5,4

Grupos foram treinados com 1, 3 ou 5 choques (0,7 mA, 60 Hz, 3s) no Contexto A. Os dados são representados como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo que recebeu 3 ou 5 choques (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

3.4.2 A generalização do medo tem perfil duradouro

A fim de avaliar a durabilidade da generalização do medo, 39 ratos foram alocados em 4 grupos (n=9-10/grupo), com base no tratamento sistêmico com veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) feito logo

após a sessão de treino forte e o intervalo entre o condicionamento e a realização dos testes (14 ou 28 dias após).

A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do tratamento ($F_{1,35} = 88,03$; $P = 0,0000001$), mas não do momento do teste ($F_{1,35} = 0,41$; $P = 0,52$), durante o Teste B, sendo que ambos os grupos tratados com ioimbina expressaram mais congelamento que os respectivos controles (Fig. 22). No entanto, todos os grupos apresentaram níveis similares de congelamento durante o Teste A (tratamento: $F_{1,35} = 2,12$; $P = 0,15$; momento dos testes: $F_{1,35} = 3,12$; $P = 0,09$).

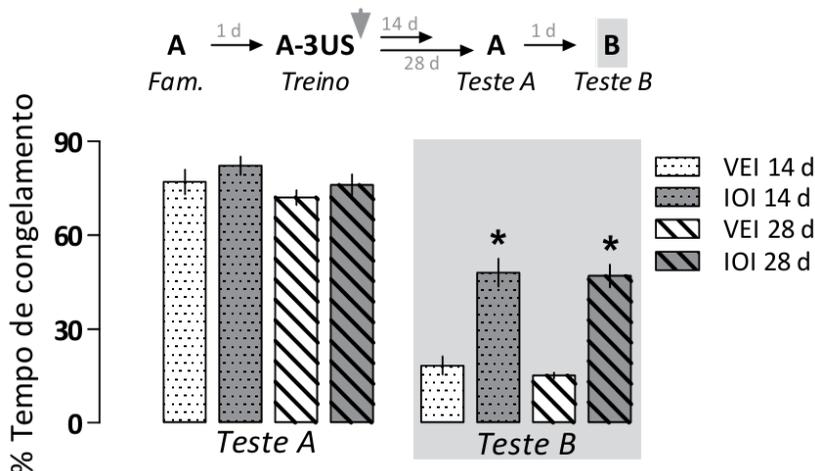


Figura 22. A generalização do medo induzida pela ioimbina é de longa duração. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados por via sistêmica (i.p.) logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual. A seta indica o momento do tratamento. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B) 14 ou 28 dias após o treino. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Esse resultado indica que a generalização do medo é uma característica duradoura associada à memória aversiva. No entanto, como a exposição ao contexto neutro sempre se deu um dia após a re-exposição ao contexto pareado, pode-se sugerir que o aumento no congelamento frente ao Contexto B tenha sido causado por uma sensibilização resultante da exposição prévia ao Contexto A, que é

capaz de evocar respostas defensivas importantes. Para descartar essa possibilidade, 20 ratos foram alocados em 2 grupos ($n=10/\text{grupo}$), com base no tratamento sistêmico com veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) realizado logo após a sessão de treino forte. No entanto, os animais só passaram pelo Teste B, 28 dias após o condicionamento, um período de tempo consideravelmente distante do evento estressor. Mesmo na ausência da exposição prévia ao Contexto A, a generalização do medo permaneceu evidente nos animais tratados com ioimbina (**Tab. 10**).

Tabela 10. A generalização do medo não depende da exposição prévia ao contexto pareado.

	Veículo (n=10)	Ioimbina (n=10)	Análise estatística
Teste B (28 dias)	14,0 ± 1,8	44,1 ± 2,7*	$t_{18} = 83,3; P = 0,0000001$

Veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual. Valores são expressos como média ± EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto neutro (Teste B, 28 dias após o treino). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste “t” de Student para grupos independentes).

Por fim, considerando a dinâmica temporal envolvida nos processos de generalização do medo e na intenção de verificar a persistência dessa característica ao longo do tempo, 20 ratos foram distribuídos em grupos ($n=10/\text{grupo}$) que receberam veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) por via sistêmica imediatamente após a sessão de treino forte. Os grupos foram re-expostos ao Contexto A 1, 7, 14, 21 e 28 dias após o condicionamento, e ao Contexto B sempre 1 dia após cada Teste A.

A ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito significativo do tratamento ($F_{1,18} = 21,25; P = 0,0002$) e da repetição dos testes ($F_{4,72} = 29,21; P = 0,0000001$), bem como uma interação desses fatores ($F_{4,72} = 19,97; P = 0,0000001$). De maneira interessante, apenas o grupo controle apresentou uma redução substancial no tempo de congelamento nos Testes A realizados 21 e 28 dias após o condicionamento (**Fig. 23A**). Embora as re-exposições ao contexto pareado tenham sido curtas, é possível que esse resultado reflita a extinção da memória de medo ao longo dessas exposições repetidas. Como os níveis de congelamento permaneceram inalterados no grupo tratado com ioimbina, esse resultado pode ser um indicativo de que essa memória é menos sensível

à extinção. Com relação aos Testes B, a ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito significativo do tratamento ($F_{1,18} = 95,7$; $P = 0,0000001$) e da repetição dos testes ($F_{4,72} = 14,2$; $P = 0,0000001$) durante as exposições ao Contexto B. O grupo tratado com ioimbina apresentou índices de congelamento maiores que o grupo controle durante todos os Testes B realizados (**Fig. 23B**). No entanto, ambos os grupos apresentaram um aumento gradual na expressão de congelamento durante os Testes B, com diferença significativa alcançada 22 ou 29 dias após o condicionamento, condizendo com a perda da especificidade das memórias com o passar do tempo (WILTGEN, SILVA, 2007).

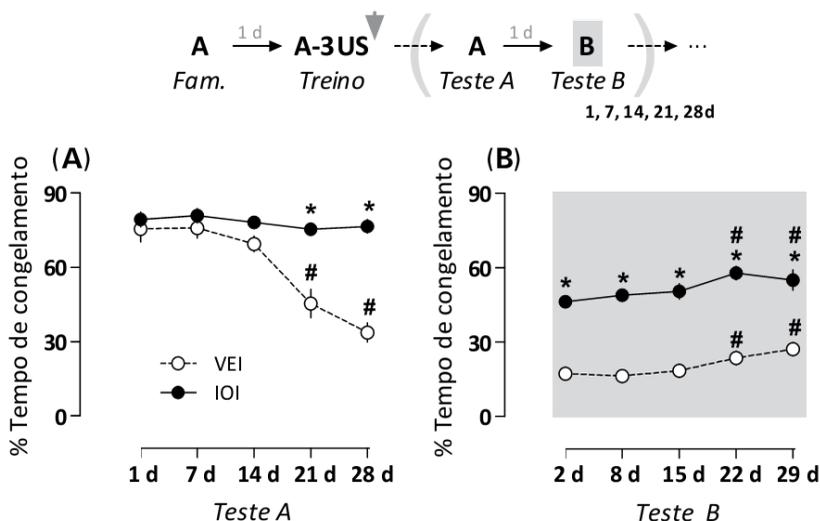


Figura 23. A generalização do medo persiste por, no mínimo, 29 dias. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual. A seta indica o momento do tratamento. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao (A) contexto pareado (Teste A) ou (B) neutro (Teste B) testados sequencialmente a cada 7 dias depois do treino, por 28 dias. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle no mesmo período, # indica uma diferença significativa em relação ao próprio grupo durante o primeiro teste (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

3.4.3 A memória inapropriada é mais resistente à extinção

Para verificar se a memória inapropriada é menos susceptível à extinção, 22 ratos foram alocados em 2 grupos ($n=11$ /grupo) com base no tratamento sistêmico com veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) realizado imediatamente após a sessão de treino forte. O perfil comportamental foi confirmado com a realização dos Testes A_1 e B_1 , seguido por uma sessão de extinção (15 min) no dia seguinte. A retenção da memória de extinção e seus efeitos sobre a generalização do medo foram avaliados por uma segunda exposição aos contextos, denominadas Testes A_2 e B_2 .

O grupo tratado com ioimbina apresentou mais congelamento durante o Teste B_1 quando comparado ao controle ($t_{20} = 26,7$; $P = 0,00005$), com níveis de congelamento comparáveis ao controle durante o Teste A_1 ($t_{20} = 0,0003$; $P = 0,98$); **Fig. 24A**). Durante a sessão de extinção, a ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito significativo para os fatores tratamento ($F_{1,20} = 18,3$; $P = 0,0003$) e 'blocos de extinção' ($F_{4,80} = 37,7$; $P = 0,0000001$), bem como uma interação entre esses fatores ($F_{4,80} = 4,2$; $P = 0,004$). Ambos os grupos apresentaram menos congelamento do segundo ao quinto bloco de 3-min de extinção quando comparado ao primeiro, mas a taxa de aquisição dessa memória foi significativamente menor no grupo tratado com ioimbina a partir do terceiro bloco de extinção (**Fig. 24B**). Além disso, animais que receberam ioimbina apresentaram mais congelamento que os controles durante os Testes A_2 ($t_{20} = 22,2$; $P = 0,0001$) e B_2 ($t_{20} = 10,05$; $P = 0,005$; **Fig. 24C**).

Quando os Testes A_1/A_2 e B_1/B_2 foram comparados (antes/após a sessão de extinção; **Fig. 24A** e **24C**), a ANOVA de medidas repetidas demonstrou um efeito significativo para o tratamento (Teste A: $F_{1,20} = 14,5$; $P = 0,001$; Teste B: $F_{1,20} = 28,13$; $P = 0,00003$) e reteste (Teste A: $F_{1,20} = 151,4,97$; $P = 0,0000001$; Teste B: $F_{1,20} = 6,86$; $P = 0,01$), bem como uma interação entre esses fatores (Teste A: $F_{1,20} = 24,2$; $P = 0,00008$; Teste B: $F_{1,20} = 4,17$; $P = 0,05$). Após a sessão de extinção, ambos os grupos apresentaram níveis menores de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A_2) quando comparados à exposição nesse mesmo contexto antes da extinção (Teste A_1). Mesmo assim, a resposta condicionada só foi virtualmente "eliminada" no grupo controle, *i.e.*, o grupo tratado com ioimbina não foi capaz de reter a memória de extinção tão bem. Também houve uma redução do congelamento no grupo tratado com ioimbina durante o Teste B_2 quando comparado ao Teste B_1 , embora ele tenha permanecido maior que o observado no grupo controle.

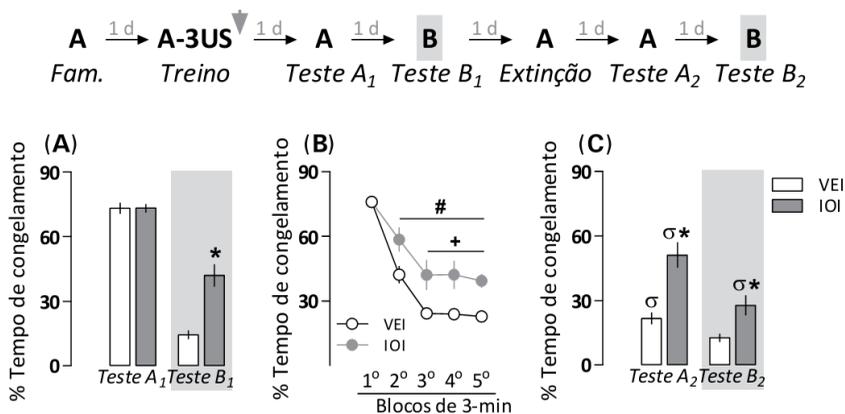


Figura 24. A memória inapropriada é mais resistente à extinção. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual. **(A)** O comportamento frente aos contextos pareado (Teste A₁) e neutro (Teste B₁) foi verificado nos dias subsequentes. **(B)** No dia seguinte, os animais passaram por uma sessão de extinção (15 min) no contexto A, seguido **(C)** por novos testes nos contextos pareado (Teste A₂) e neutro (Teste B₂) nos dias seguintes. A seta indica o momento do tratamento. Valores são expressos como média ± EPM da porcentagem de congelamento. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle, # indica uma diferença significativa em relação ao próprio grupo durante o primeiro bloco da extinção, + indica uma diferença significativa com relação ao controle no mesmo respectivo bloco da sessão de extinção e σ indica uma diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo durante o Teste A₁ ou B₁ (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls ou teste “t” de Student para grupos independentes).

Como a memória facilitada pela ioimbina pode ter sido superconsolidada, o prejuízo na extinção pode ser resultado da menor susceptibilidade de labilização frente à reativação induzida pela sessão de extinção, como já observado em outros estudos (AKIRAV *et al.*, 2009). Para verificar essa possibilidade, 19 ratos foram alocados em 2 grupos (n=9-10/grupo) com base no tratamento sistêmico com veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) realizado imediatamente após a sessão de treino forte. O protocolo de extinção se deu como no caso anterior, mas ambos os grupos receberam D-cicloserina (15 mg/kg), um agonista parcial de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, 30 min antes da sessão de extinção.

O grupo tratado com ioimbina apresentou mais congelamento durante o Teste B₁ quando comparado ao controle ($t_{17} = 90,7$; $P = 0,0000001$), e congelamento comparável ao controle durante o Teste A₁ ($t_{17} = 0,002$; $P = 0,97$; **Fig. 25A**). Durante a sessão de extinção, a ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito significativo para o fator ‘blocos de extinção’ ($F_{4,68} = 7,32$; $P = 0,00006$) e uma tendência relacionada ao tratamento ($F_{1,17} = 3,7$; $P = 0,07$), bem como uma interação entre esses fatores ($F_{4,68} = 2,53$; $P = 0,05$). Ambos os grupos apresentaram menos congelamento do segundo ao quinto bloco de 3-min de extinção quando comparados ao primeiro, alcançando níveis similares de extinção (**Fig. 25B**). Mesmo que a extinção tenha sido facilitada pela D-cicloserina, os animais tratados com ioimbina continuaram apresentando mais congelamento que o grupo controle durante os Testes A₂ ($t_{17} = 31,6$; $P = 0,00003$) e B₂ ($t_{17} = 40,4$; $P = 0,0001$; **Fig. 25C**).

Quando os Testes A₁/A₂ e B₁/B₂ foram comparados (**Fig. 25A e 25C**), a ANOVA de medidas repetidas demonstrou um efeito significativo para o tratamento (Teste A: $F_{1,17} = 7,2$; $P = 0,01$; Teste B: $F_{1,17} = 120,6$; $P = 0,0000001$) e reteste (Teste A: $F_{1,17} = 295,5$; $P = 0,0000001$; Teste B: $F_{1,17} = 25,1$; $P = 0,0001$), bem como uma interação entre esses fatores (Teste A: $F_{1,17} = 18,4$; $P = 0,0005$; Teste B: $F_{1,17} = 13,1$; $P = 0,002$) tanto para o Contexto A quanto B. Ambos os grupos apresentaram níveis menores de congelamento frente ao contexto pareado depois da sessão de extinção (Teste A₂) que antes (Teste A₁), embora, novamente, o grupo tratado com ioimbina não tenha sido capaz de reter a memória de extinção tão bem, mesmo com a administração de D-cicloserina. Também houve uma redução significativa do congelamento no grupo tratado com ioimbina durante o Teste B₂ quando comparado ao Teste B₁, embora eles tenham se mantido com níveis maiores que os observados no grupo controle. Dessa forma, o tratamento com D-cicloserina não foi capaz de superar a resistência à extinção da memória inapropriada, que se manteve menos sensível a essa intervenção comportamental.

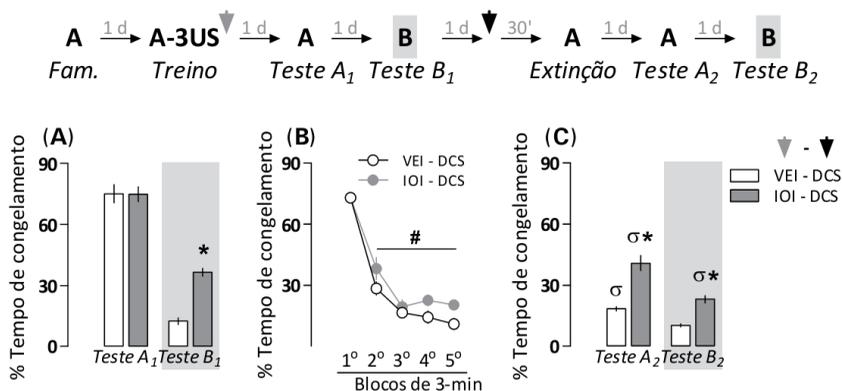


Figura 25. A D-cicloserina facilita a extinção da memória, mas não reverte a generalização do medo. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual. **(A)** O comportamento frente aos contextos pareado (Teste A₁) e neutro (Teste B₁) foi verificado nos dias subsequentes. **(B)** No dia seguinte, todos os animais receberam uma injeção de D-cicloserina (15 mg/kg) 30 min antes da sessão de extinção (15 min) no contexto A, seguido **(C)** por novos testes nos contextos pareado (Teste A₂) e neutro (Teste B₂) nos dias seguintes. As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle, # indica uma diferença significativa em relação ao próprio grupo durante o primeiro bloco da extinção, σ indica uma diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo durante o Teste A₁ ou B₁ (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls ou teste “t” de Student para grupos independentes).

Por fim, o índice de extinção foi utilizado para estimar a eficiência da aquisição da extinção, de acordo com a redução no tempo de congelamento observado durante os 15 min de exposição ao Contexto A e, por isso, foi calculado e comparado entre os quatro grupos experimentais dos dois experimentos anteriores. A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o tratamento após o condicionamento ($F_{1,37} = 27,3$; $P = 0,0000001$) e tratamento antes da extinção ($F_{1,37} = 44,8$; $P = 0,0000001$). A D-cicloserina, por si só, aumentou a eficiência da extinção no grupo pré-tratado com veículo (**Tab. 11**). Embora a ioimbina tenha reduzido a eficácia da extinção, a D-cicloserina conseguiu recuperar esse índice a níveis similares ao do grupo controle. Dessa forma, embora a D-cicloserina seja capaz de facilitar a aquisição da extinção, o grupo tratado com ioimbina parece ser incapaz de reter essa memória de maneira adequada, já que a

facilitação da extinção não refletiu em níveis menores de congelamento nos testes subsequentes.

Tabela 11. A D-cicloserina facilita a aquisição da memória de extinção.

Pós-treino	Veículo		Ioimbina	
	Veículo (n=11)	D-cicloserina (n=9)	Veículo (n=10)	D-cicloserina (n=10)
Índice de extinção	0,70 ± 0,01	0,85 ± 0,02*	0,48 ± 0,04*	0,72 ± 0,03 [#]

Os dados são referentes à sessão de extinção ilustrada nas figuras 27 e 28. O índice de extinção foi calculado conforme descrito na metodologia, variando de 0,0 a 1,0, sendo que valores maiores indicam uma maior eficiência na aquisição da extinção. Os dados são representados como média ± EPM. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo veículo-veículo, # indica uma diferença significativa em relação ao grupo ioimbina-veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

3.4.4 A memória inapropriada é resistente ao efeito antiaversivo do midazolam

Tradicionalmente, a terapêutica do PTSD se sustenta com o uso de agentes que reduzam as respostas de medo e ansiedade, não pondo um fim na memória traumática. A eficiência desse tipo de intervenção nem sempre alcança níveis desejados e são poucos os fármacos realmente úteis (RASKIND, 2009). Mesmo os benzodiazepínicos, que são drogas de primeira escolha para o tratamento de vários transtornos de ansiedade, não apresentam eficácia significativa em pacientes com PTSD (HAWKINS *et al.*, 2013; ROSEN *et al.*, 2013). Para investigar se o efeito antiaversivo dessa classe de fármacos estaria reduzido em animais sujeitos ao protocolo de generalização do medo, 36 ratos foram alocados em 4 grupos (n=8-10/grupo) de acordo com o pré-tratamento, realizado imediatamente após a sessão de treino forte, com veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) e o tratamento realizado no dia seguinte, 30 min antes da re-exposição ao Contexto A (sessão de reativação), com veículo ou o benzodiazepínico midazolam (0,5 mg/kg).

A ANOVA de duas vias com repetição indicou um efeito significativo para os fatores pré-tratamento ($F_{1,32} = 6,36$; $P = 0,01$), tratamento ($F_{1,32} = 7,12$; $P = 0,01$) e re-exposição ao Contexto A ($F_{1,32} = 8,57$; $P = 0,006$), bem como uma interação entre todos os fatores ($F_{1,32} =$

9,34; $P = 0,004$) frente ao contexto pareado. O midazolam reduziu o tempo de congelamento no grupo pré-tratado com veículo durante a sessão de reativação da memória (**Fig. 26**), confirmando o seu efeito antiaversivo. Animais tratados com ioimbina, no entanto, se mostraram resistentes à ação dessa mesma dose de midazolam. Todos os grupos mantiveram os mesmos níveis de congelamento durante o Teste A, indicando que o efeito do benzodiazepínico não teve qualquer efeito duradouro sobre a memória de medo. A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo quanto ao fator pré-tratamento durante o Teste B ($F_{1,32} = 67,6$; $P = 0,0000001$), sendo que a generalização do medo foi mantida nos grupos pré-tratados com ioimbina, independente da administração prévia do midazolam.

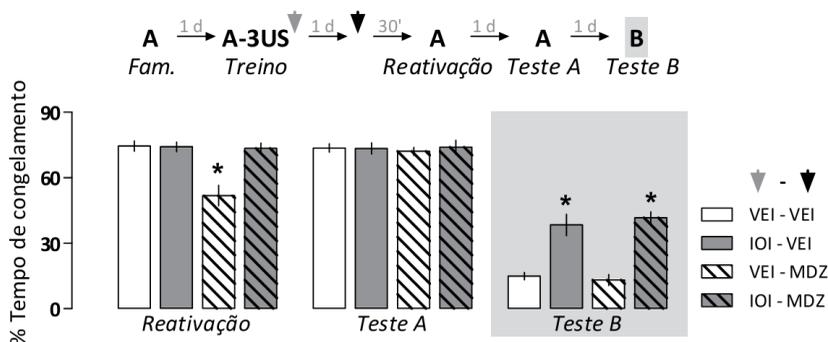


Figura 26. A memória inapropriada torna os animais resistentes ao efeito antiaversivo do midazolam. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual. No dia seguinte, os animais receberam uma injeção de veículo ou midazolam (MDZ; 0,5 mg/kg, i.p.) 30 min antes da sessão de evocação/reactivação da memória no contexto A. Os Testes A e B aconteceram nos dias seguintes. As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Reativação, Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias com ou sem repetição seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

3.4.5 A memória traumática induzida pela hiperativação noradrenérgica é menos susceptível à labilização

Para investigar se a memória de medo superconsolidada seria resistente aos efeitos amnésicos visando prejudicar a etapa de reconsolidação, 58 animais foram distribuídos em 6 grupos ($n=9$ -

10/grupo), com base no tratamento sistêmico realizado imediatamente após a sessão de treino forte com veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) e o tratamento realizado imediatamente após à sessão de reativação da memória no dia seguinte, com veículo, o agonista de receptores α_2 -adrenérgicos clonidina (0,3 mg/kg) ou o fitocanabinoide canabidiol (10 mg/kg).

A ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do pré-tratamento ($F_{1,52} = 34,8$; $P = 0,0000001$), tratamento ($F_{2,52} = 11,2$; $P = 0,00009$) e re-exposições ao Contexto A ($F_{1,52} = 113,6$; $P = 0,0000001$), além de uma interação entre todos os fatores ($F_{2,52} = 24,4$; $P = 0,0000001$). Embora nenhuma diferença tenha sido observada durante a sessão de reativação, tanto o canabidiol quanto a clonidina reduziram o tempo de congelamento durante o Teste A nos animais pré-tratados com veículo (**Fig. 27**), indicando um prejuízo na reconsolidação. Esse efeito, contudo, não foi evidente nos animais que receberam ioimbina previamente. No Teste B, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do pré-tratamento ($F_{1,52} = 235,2,2$; $P = 0,0000001$), sendo que todos os animais que receberam ioimbina congelaram mais que os controles, indicando generalização do medo, independente do tratamento com os agentes amnésicos.

A resistência ao efeito amnésico pode indicar de que essa memória superconsolidada não seria facilmente labilizada frente à sua reativação, como observado nas memórias mais próximas do perfil do PTSD (SOETER, KINDT, 2013). Como a D-cicloserina favorece a desestabilização de memórias mais intensas (BUSTOS *et al.*, 2010), esse agente poderia resgatar o efeito amnésico das demais drogas nas condições adotadas. Então, antes de verificar essa possibilidade, foi necessário demonstrar que a dose adotada dessa droga não seria capaz de interferir na expressão durante a sessão de reativação. Além disso, como essa mesma dose facilitou a aquisição da extinção frente a uma evocação prolongada, foi preciso verificar se esse mesmo efeito seria evidente frente a um protocolo mais curto de reativação (3 min). Para isso, 18 animais foram alocados em 2 grupos ($n=9$ /grupo) que receberam o tratamento sistêmico com veículo ou D-cicloserina (15 mg/kg) 30 min antes da reativação. A D-cicloserina não causou nenhuma alteração na dose utilizada (**Tab. 12**).

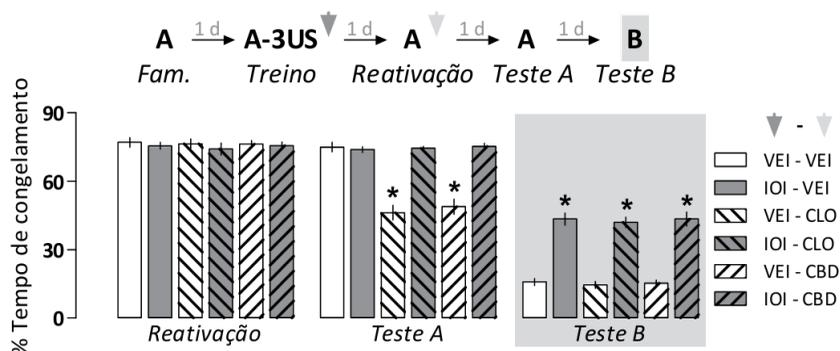


Figura 27. A memória inapropriada é resistente ao efeito de agentes amnésicos sobre a reconsolidação. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual. No dia seguinte, imediatamente após a reativação da memória de medo, os animais receberam uma injeção de veículo, clonidina (CLO; 0,3 mg/kg, i.p.) ou canabidiol (CBD; 10 mg/kg, i.p.). As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Reativação, Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias com ou sem repetição seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Tabela 12. A D-cicloserina não apresenta efeito *per se* sobre a memória de medo contextual.

	Veículo (n=9)	D-cicloserina (n=9)	Análise estatística
Reativação	71,2 \pm 3,2	70,5 \pm 3,0	$t_{16} = 0,02$; $P = 0,89$
Teste A	73,5 \pm 2,4	74,9 \pm 2,0	$t_{16} = 0,19$; $P = 0,67$
Teste B	16,3 \pm 1,8	17,6 \pm 1,1	$t_{16} = 0,38$; $P = 0,54$

Veículo ou D-cicloserina (15 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes da sessão de reativação da memória de medo contextual. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Reativação, Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste “t” de Student para grupos independentes).

Para investigar se a maior resistência à labilização justificaria a ausência de efeitos amnésicos observados nos animais tratados com ioimbina, 51 ratos foram distribuídos em 6 grupos ($n=7-9$ /grupo), com base no tratamento realizado imediatamente após a sessão de treino forte com veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) e o tratamento realizado

imediatamente após uma breve sessão de reativação da memória no dia seguinte, com veículo, clonidina (0,3 mg/kg) ou canabidiol (10 mg/kg). Nesse caso, todos os grupos receberam D-cicloserina (15 mg/kg) 30 min antes da sessão de reativação da memória.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do tratamento após a reativação ($F_{2,45} = 14,9$; $P = 0,00001$) e re-exposições ao Contexto A ($F_{1,45} = 152,8$; $P = 0,0000001$), além de uma interação entre esses fatores ($F_{2,45} = 49,9$; $P = 0,0000001$) durante as exposições ao Contexto A. Embora nenhuma diferença tenha sido observada durante a sessão de reativação, a clonidina e o canabidiol reduziram o tempo de congelamento em todos os grupos tratados durante o Teste A (**Fig. 28**), indicando um prejuízo na reconsolidação, mesmo na memória disfuncional induzida pela ioimbina. Com relação ao Teste B, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do pré-tratamento ($F_{1,45} = 18,1$; $P = 0,0001$) e tratamento ($F_{2,45} = 11,04$; $P = 0,0001$), bem como uma interação entre esses fatores ($F_{2,45} = 10,3$; $P = 0,0002$). Nesse caso, o efeito amnésico da clonidina ou canabidiol sobre a reconsolidação também reverteu a generalização do medo induzida pela ioimbina.

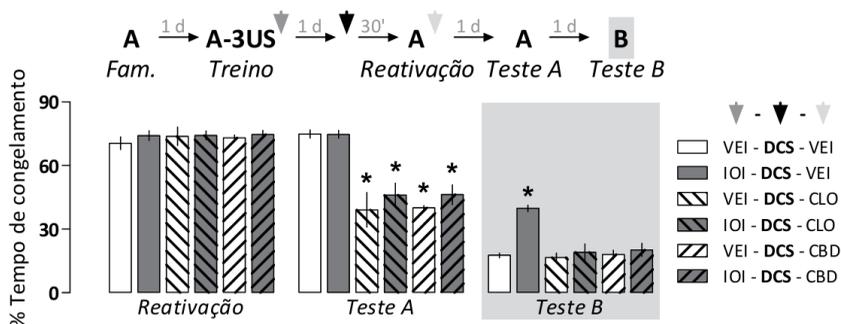


Figura 28. A D-cicloserina torna a memória inapropriada sensível ao efeito amnésico de drogas sobre a reconsolidação. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino forte. No dia seguinte, todos os animais receberam uma injeção de D-cicloserina (DCS; 15 mg/kg, i.p.) 30 min antes da sessão de reativação. Imediatamente após, os animais receberam uma injeção de veículo, clonidina (CLO; 0,3 mg/kg, i.p.) ou canabidiol (CBD; 10 mg/kg, i.p.). As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Reativação, Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias com ou sem repetição seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

3.4.6 O recrutamento central de receptores β -adrenérgicos sustenta a superconsolidação da memória

Para investigar a contribuição relativa de receptores β -adrenérgicos centrais ou periféricos na generalização do medo, 53 animais foram alocados em seis grupos ($n=8-10/\text{grupo}$) com base no pré-tratamento realizado imediatamente após a sessão de treino forte, com veículo, e os antagonistas não-seletivos de receptores β -adrenérgicos propranolol (10 mg/kg) ou nadolol (10 mg/kg). Os grupos receberam um segundo tratamento, 10 min depois, com veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg).

A ANOVA de duas vias demonstrou um efeito do pré-tratamento ($F_{2,47} = 4,42$; $P = 0,01$), tratamento ($F_{1,47} = 32,4$; $P = 0,000001$) e uma interação entre esses fatores ($F_{2,47} = 12,65$; $P = 0,00004$) durante o Teste B. Animais que receberam ioimbina apresentaram níveis altos de congelamento durante o Teste B (**Fig. 29**), e apenas o pré-tratamento com o propranolol preveniu a generalização de medo, confirmando o recrutamento de receptores β -adrenérgicos presentes no sistema nervoso central para a indução desse efeito. Todos os grupos apresentaram níveis semelhantes de congelamento durante o Teste A (pré-tratamento: $F_{2,47} = 0,26$; $P = 0,77$; tratamento: $F_{1,47} = 0,08$; $P = 0,77$).

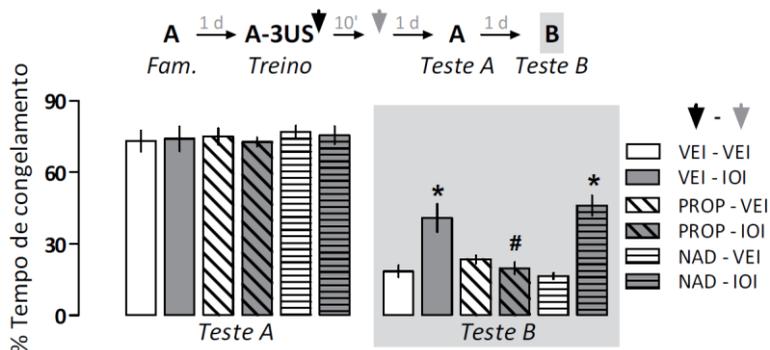


Figura 29. A ativação de receptores β -adrenérgicos centrais levam à formação da memória inapropriada. Veículo (VEI), propranolol (PROP; 10 mg/kg) ou nadolol (NAD; 10 mg/kg) foram administrados por via sistêmica (i.p.) logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual, seguida, 10 min após, por uma injeção de veículo ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.). As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle, # indica uma diferença significativa em relação ao grupo VEI-IOI (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

3.4.7 A memória inapropriada induz aumentos na pressão arterial

Além da generalização do medo, pacientes com PTSD frequentemente apresentam um índice alto de comorbidades cardiovasculares, sendo a hipertensão a mais comum (MELLMAN *et al.*, 2009; PAULUS, ARGO, EGGE, 2013). Para investigar os reflexos do protocolo de generalização sobre respostas cardiovasculares, 28 ratos foram alocados em 3 grupos (n=9-10/grupo), com base no tratamento sistêmico e momento em que ele foi realizado (veículo ou ioimbina logo após o treino forte ou ioimbina 6 h após o treino forte). Ao fim do experimento comportamental, a pressão sistólica foi avaliada.

A ANOVA de uma via demonstrou um efeito significativo durante o Teste B ($F_{2,25} = 24,6$; $P = 0,0000001$), mas não durante o Teste A ($F_{2,25} = 0,43$; $P = 0,65$). Apenas o grupo que recebeu ioimbina imediatamente após a sessão de treino apresentou o perfil de generalização de medo (**Fig. 30A**), como já caracterizado anteriormente. A ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para a pressão sistólica ($F_{2,25} = 34,9$; $P = 0,0000001$), sendo observado um aumento significativo nessa medida apenas no grupo que apresentou generalização do medo (**Fig. 30B**).

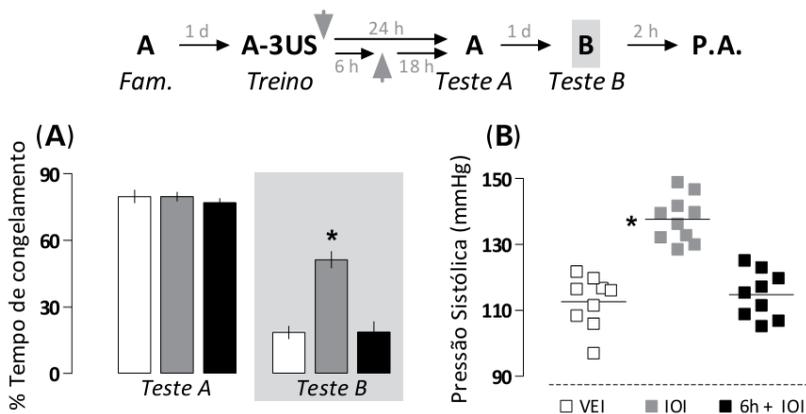


Figura 30. A generalização do medo acompanha aumentos na pressão sistólica. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual (0 h) ou 6 h após. As setas indicam o momento do tratamento. Valores são expressos como média \pm EPM da (A) porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B) ou (B) média dos valores de pressão sistólica (mmHg) de cada indivíduo. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

3.4.8 A memória de medo inapropriada leva à sensibilização

A sensibilização das respostas defensivas é outra característica observada em pacientes com PTSD, que apresentam reações mais acentuadas de medo e ansiedade (DYKMAN, ACKERMAN, NEWTON, 1997; ANISMAN, 2011). Para avaliar a ocorrência de sensibilização, 24 ratos foram alocados em 2 grupos (n=12/grupo) com base no tratamento sistêmico com veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) realizado imediatamente após o treino forte. Três dias após o Teste B, os animais foram submetidos ao LCE para avaliação das respostas defensivas. Um grupo *naïve* (n=10), não submetido ao protocolo de condicionamento de medo ou tratamentos, também foi submetido ao teste como controle geral.

De acordo aos resultados prévios, a ioimbina induziu um perfil claro de generalização do medo (**Tab. 13**). No LCE, a ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para %TBA ($F_{2,31} = 4,7$; $P = 0,017$), %EBA ($F_{2,31} = 4,01$; $P = 0,03$) e PAR ($F_{2,31} = 5,17$; $P = 0,011$), havendo uma redução significativa na %TBA (**Fig. 31A**) e %EBA (**Fig. 31B**), acompanhada por um aumento nas PAR (**Fig. 31C**) no grupo tratado com ioimbina, caracterizando um perfil “mais ansioso”, com sensibilização das respostas defensivas. Adicionalmente, nenhuma alteração foi observada quanto às EBF ($F_{2,31} = 1,9$; $P = 0,16$), indicando ausência de alteração na atividade exploratória geral (**Fig. 31D**).

Tabela 13. A generalização do medo é consequência da potencialização noradrenérgica durante a consolidação da memória.

	Veículo (n=12)	Ioimbina (n=12)	Análise estatística
Teste A	71,9 ± 3,4	75,4 ± 3,4	$t_{22} = 0,53$; $P = 0,47$
Teste B	11,6 ± 1,4	42,9 ± 5,2*	$t_{22} = 33,4$; $P = 0,00001$

Veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual. Valores são expressos como média ± EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste “t” de Student para grupos independentes).

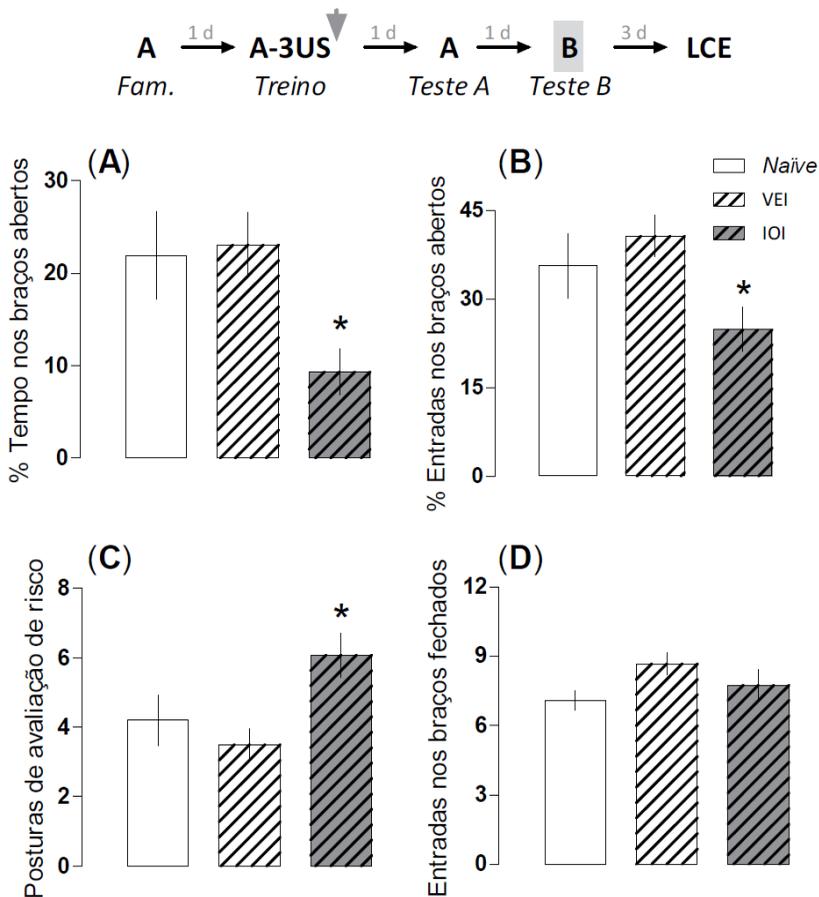


Figura 31. A memória inapropriada acompanha sensibilização das respostas defensivas. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual. Um grupo adicional de animais *naïve* foi utilizado como controle. A seta indica o momento do tratamento. Valores são expressos como média \pm EPM da (A) porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA), (B) porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA), (C) número de posturas de avaliação de risco (PAR) e (D) número de entradas nos braços fechados (EBF). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos grupos controles (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

3.5 DISCUSSÃO

A ioimbina causou uma incapacidade em restringir as respostas defensivas ao contexto pareado somente quando administrada em momentos próximos à aquisição da memória de medo. Isso confirma que a generalização do medo resulta da hiperativação adrenérgica durante o processo de consolidação, permitindo que a memória seja potencializada de maneira exagerada, ou superconsolidada, como o mecanismo proposto para a gênese da memória traumática do PTSD (PITMAN, 1989). Com o uso do treino forte, todos os grupos apresentaram um perfil de congelamento alto e similar frente ao contexto pareado, supostamente por atingir um nível máximo de expressão desse comportamento. Concordando com isso, o uso de 3 ou 5 choques na sessão de treino induzem níveis comparáveis de congelamento durante o Teste A, confirmando que o nível máximo dessa resposta comportamental foi atingido. De maneira geral, o requisito de atingir níveis máximos de congelamento frente ao contexto pareado reforça a teoria assintótica da generalização do medo, proposta anteriormente.

A resposta generalizada de medo é duradoura, sendo mantida por, pelo menos, um mês. Esse resultado indica que a memória de medo disfuncional gerada em condições de hiperativação adrenérgica persiste ao longo do tempo, acompanhada de outras alterações comportamentais, como acontece no PTSD (PITMAN, 1989; ELZINGA, BREMNER, 2002; ZOLADZ, DIAMOND, 2013). De maneira importante, essa resposta de generalização do medo não é um simples reflexo ou sensibilização causada pela exposição prévia ao contexto pareado, uma vez que é mantida por 28 dias mesmo omitindo exposições subsequentes ao contexto condicionado. Como a persistência da memória traumática é relevante para a manutenção do PTSD, estudos translacionais visando a reversão desse perfil poderiam fornecer alternativas interessantes para o tratamento desse transtorno. A caracterização dessa resposta exacerbada de longa duração oferece o respaldo necessário para assegurar que a memória estudada apresenta características comuns aos aspectos inapropriados das memórias traumáticas relacionadas a alguns transtornos psiquiátricos. Obviamente, a maioria dos estudos acaba visando a reversão da generalização do medo a curto prazo, já que a manutenção de animais para testes em memórias remotas requer cuidados e investimentos adicionais.

Frente a um protocolo próprio de extinção da memória de medo, animais tratados com ioimbina apresentaram uma menor taxa de

extinção que o grupo controle, mantendo uma expressão maior de comportamentos defensivos frente ao contexto pareado e o perfil de generalização do medo, um resultado que concorda com o observado em humanos sadios tratados com ioimbina (SOETER, KINDT, 2012). Embora a extinção seja o princípio da terapia de exposição para o tratamento de pacientes com PTSD (DASKALAKIS, YEHUDA, DIAMOND, 2013; FITZGERALD, SEEMANN, MAREN, 2014; HOFMANN, FANG, GUTNER, 2014; MCGUIRE, LEWIN, STORCH, 2014; MILAD, ROSENBAUM, SIMON, 2014), a memória traumática nesses pacientes parece ser refratária a essa intervenção (MILAD *et al.*, 2009; CAIN, MAYNARD, KEHNE, 2012), limitando o seu uso na clínica. Como a memória traumática é formada de maneira exagerada em pacientes com PTSD, é possível que a memória de extinção – com função de suprimir a expressão da memória original – tenha uma relevância e retenção muito menor, sendo facilmente superada pela memória traumática (QUIRK, MUELLER, 2008; ORSINI, MAREN, 2012).

Na tentativa de contornar essa limitação, alguns tratamentos adjuvantes são sugeridos como potenciais facilitadores do processo de extinção (DUNLOP, MANSSON, GERARDI, 2012; FITZGERALD, SEEMANN, MAREN, 2014; HOFMANN, FANG, GUTNER, 2014). Entre eles, grande destaque é dado para a D-cicloserina, que facilita a extinção da memória sem causar maiores efeitos secundários (RICHARDSON, LEDGERWOOD, CRANNEY, 2004; VERVLIET, 2008; HOFMANN, WU, BOETTCHER, 2013), motivo pela qual ela é amplamente testada em humanos (KLUMPERS *et al.*, 2012; SMITS *et al.*, 2013; DIFEDE *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2014; ROTHBAUM *et al.*, 2014). No protocolo adotado, a D-cicloserina aumentou a taxa de aquisição da extinção a níveis similares ao observado no grupo controle. Contudo, a retenção dessa memória não aconteceu de maneira satisfatória, já que o grupo tratado com ioimbina permaneceu expressando respostas defensivas robustas frente aos contextos pareado e neutro, mesmo após receber D-cicloserina. Dessa forma, o uso de uma droga capaz de facilitar a labilização e potencializar a extinção não foi eficaz em atenuar a memória de medo e resposta generalizada inapropriada de maneira suficiente. Embora esse resultado seja desestimulante, limitando o uso de intervenções na extinção como uma alternativa na clínica, ele sustenta a premissa de que a memória modelada nas condições adotadas é de magnitude considerável, apresentando características claras de uma memória patológica. Além disso, também é possível que esse protocolo seja útil

para a triagem de novos agentes que possam facilitar a extinção e superar essa limitação, ou até mesmo na elucidação de estruturas encefálicas envolvidas na resistência à extinção.

Além da extinção, outras medidas visam atenuar a expressão das respostas de medo no PTSD, como o uso de drogas com efeito antiaversivo, sendo que a sertralina e paroxetina – antidepressivos que agem inibindo seletivamente a captação de serotonina – são os principais agentes utilizados (BRADY *et al.*, 2000; MARSHALL *et al.*, 2001). Embora alguns estudos indiquem um efeito potencial do alprazolam, um benzodiazepínico de alta potência, essa classe de fármaco apresenta pouca eficácia no PTSD (BRAUN *et al.*, 1990). A maioria dos pacientes é resistente aos efeitos antiaversivos dos benzodiazepínicos, podendo até mesmo apresentar uma piora no quadro clínico (HAWKINS *et al.*, 2013; ROSEN *et al.*, 2013). Concordando com essa premissa, as respostas defensivas expressas frente à evocação da memória de medo inapropriada foram insensíveis ao efeito antiaversivo do midazolam. Em doses mais altas, essa droga pode prejudicar a reconsolidação, atenuando a memória de maneira duradoura (BUSTOS, MALDONADO, MOLINA, 2006; STERN *et al.*, 2012). No nosso caso, a resposta defensiva frente ao contexto pareado foi idêntica nos dias seguintes ao tratamento com midazolam, indicando que a memória traumática permaneceu intacta, até porque a dose utilizada foi três vezes menor que a necessária para induzir efeitos amnésicos (0,5 vs. 1,5 mg/kg). Como os benzodiazepínicos parecem inefetivos no controle de sintomas do PTSD (DAVIDSON, 2004), o protocolo adotado foi, mais uma vez, capaz de mimetizar características relacionadas e esse transtorno psiquiátrico. Além disso, mesmo que os agentes antiaversivos representem grande parte do arsenal terapêutico atual, o uso dessas drogas tem utilidade meramente paliativa, já que a modulação da resposta defensiva aconteceria sem atenuar a memória traumática responsável pelo desenvolvimento e manutenção do PTSD (CORLETT, TAYLOR, 2013; PARSONS, RESSLER, 2013).

Enquanto a extinção tem um caráter temporário, sujeito à recuperação espontânea e reinstalação (QUIRK, MUELLER, 2008; MAREN, PHAN, LIBERZON, 2013), interferências que afetam a reconsolidação da memória geralmente produzem efeitos permanentes, por modulação direta sobre a memória de medo original (ALBERINI, 2011). Por exemplo, o efeito amnésico da clonidina e canabidiol sobre a reconsolidação da memória de medo condicionado é de longa duração em roedores (GAMACHE, PITMAN, NADER, 2012; STERN *et al.*, 2012). No entanto, a memória superconsolidada não foi prejudicada

pelas doses amnésicas desses mesmos agentes. Uma possível explicação para isso é que a memória de medo inapropriada pode ser menos susceptível à labilização, que é necessária para desencadear o processo de reconsolidação. Sustentando essa premissa, a administração de D-cicloserina antes da sessão de reativação permitiu o efeito da clonidina e canabidiol sobre a reconsolidação, com atenuação do medo condicionado e generalizado. Em outros estudos, a D-cicloserina também facilitou a labilização de uma memória aversiva de alta intensidade (BUSTOS *et al.*, 2010), reforçando o seu potencial como adjuvante terapêutico. A menor susceptibilidade das memórias inapropriadas ao efeito amnésico de drogas pode, ao menos em parte, explicar os resultados discrepantes apontados por diversos estudos que buscam agentes que prejudiquem a reconsolidação de memórias de medo (PITMAN *et al.*, 2002; VAIVA *et al.*, 2003; STEIN *et al.*, 2007; MURAVIEVA, ALBERINI, 2010; DEBIEC, BUSH, LEDOUX, 2011; HOGE *et al.*, 2012; SOETER, KINDT, 2012; 2013). Diferenças nos protocolos (*e.g.*, procedimento de treino adotado) utilizados em cada um desses casos poderiam justificar as divergências observadas entre um estudo e outro, já que a magnitude da memória modelada não necessariamente seria a mesma. Talvez por conta disso, mesmo que muitos estudos pré-clínicos apresentem resultados promissores, poucos deles são transpostos para a clínica, quando o desafio é modular uma memória traumática. Os resultados apresentados também destacam dois aspectos: primeiro, a expressão generalizada do medo – e provavelmente as demais consequências associadas à memória disfuncional – pode ser atenuada pela associação de intervenções farmacológicas que possibilitem o prejuízo da reconsolidação, reiterando o interesse nessa etapa da memória como potencial alvo terapêutico. A segunda questão é que o mecanismo de ação da droga capaz de prejudicar a reconsolidação da memória não parece apresentar uma relação direta com o mecanismo neuroquímico responsável por induzir a sua superconsolidação, já que tanto a clonidina quanto o canabidiol foram igualmente efetivos.

Mesmo que a D-cicloserina tenha permitido o efeito de agentes amnésicos durante a reconsolidação da memória de medo, ela foi incapaz, por si só, de potencializar a extinção de maneira eficiente. Uma possibilidade para justificar esses resultados é que os efeitos da D-cicloserina sobre a reconsolidação e extinção podem envolver mecanismos distintos ou, ao menos, atuar sobre etapas diferentes desses processos (PITMAN, 2011). Embora a desestabilização da memória seja necessária para desencadear a reconsolidação, ela parece não ser um requisito suficiente para a indução da extinção; ao contrário disso, a

interrupção da etapa de labilização parece mesmo ser um dos fatores que direcionariam a memória à extinção (MERLO *et al.*, 2014). Talvez por esse motivo a D-cicloserina tenha sido incapaz de facilitar a extinção ao ponto de suprimir a memória de medo generalizada eficientemente. Uma interpretação alternativa é a de que a natureza temporária e mais "frágil" da memória de extinção a tornaria menos eficaz em suprimir memórias de medo de magnitudes maiores, mesmo com a administração de D-cicloserina. Essa limitação do processo de extinção é geralmente considerada quando se busca aliviar memórias traumáticas (BOUTON, 2014). Por fim, a mesma dose de D-cicloserina adotada nesse trabalho potencializou a reconsolidação de uma memória de medo associada ao som em ratos (LEE, MILTON, EVERITT, 2006), uma divergência que provavelmente se justifica pela particularidade desse estudo ser conduzido com um protocolo que induz níveis baixos de congelamento frente ao estímulo condicionado (~ 40%), uma condição que oferece uma janela mais ampla para a potencialização da memória.

O antagonismo de receptores β -adrenérgicos centrais impediu a generalização do medo induzida pela hiperativação noradrenérgica, resultado que é consistente com o observado em humanos saudáveis (SOETER, KINDT, 2012). Em oposição a esse resultado, a eficácia limitada do propranolol em prevenir o desenvolvimento do PTSD em humanos, quando administrada após o evento traumático, foi demonstrada em alguns estudos (PITMAN *et al.*, 2002; STEIN *et al.*, 2007; COHEN *et al.*, 2011; HOGE *et al.*, 2012). Nesse caso, talvez o intervalo de longo tempo entre o trauma e a administração da droga (> 6 h depois) seja o maior responsável pela divergência apontada. Outros trabalhos indicam que o propranolol é capaz de atenuar as respostas de medo em humanos quando administrado mais próximo ao evento aversivo (BHUVANESWAR *et al.*, 2014). O papel dos receptores β -adrenérgicos na formação das memórias emocionais normais é bem estabelecido, parecendo haver pouca participação desses receptores localizados periféricamente em roedores (ROBINSON, FRANKLIN, 2007; EBRAHIMI *et al.*, 2010) ou humanos (VAN STEGEREN *et al.*, 1998). Contudo, como poucos desses trabalhos focam no estudo de memórias inapropriadas, os mesmos tem pouca relação com os resultados apresentados aqui.

Uma das vantagens do protocolo proposto é a avaliação, de uma maneira mais isolada, da participação de uma via de transmissão na indução de memórias inapropriadas. Embora algumas das características modeladas sejam observadas com a associação de eventos estressantes a protocolos de condicionamento de medo (MACKENZIE *et al.*, 2010;

OLSON *et al.*, 2011; SAUERHÖFER *et al.*, 2012), esses estímulos recrutam várias vias relacionadas ao controle do estresse, o que dificulta a caracterização das consequências induzidas por cada uma delas, isoladamente. Mesmo que o sistema noradrenérgico seja classicamente envolvido com o processamento das memórias aversivas, os resultados aqui apresentados expandem o entendimento da modulação dessa via de transmissão na formação de memórias inapropriadas. Como os receptores β -adrenérgicos são expressos em regiões encefálicas relacionadas à consolidação da memória, como o hipocampo (JI, WANG, LI, 2003), a amígdala (LALUMIERE, BUEN, MCGAUGH, 2003) e a porção medial do córtex pré-frontal (TRONEL, FEENSTRA, SARA, 2004), essas poderiam ser regiões potenciais para a ativação desses receptores e indução da memória disfuncional frente à hiperativação noradrenérgica. Coincidentemente, essas estruturas cerebrais interconectadas apresentam-se funcionalmente afetadas em pacientes com PTSD (PITMAN *et al.*, 2012; PARSONS, RESSLER, 2013; ZOLADZ, DIAMOND, 2013), o que poderia contribuir para a formação e manutenção de uma memória aversiva aberrante e persistente. No entanto, a contribuição dessas estruturas para a indução da generalização do medo permanece em investigação. Alguns estudos têm atribuído essa característica inapropriada a prejuízos na habilidade de separação de padrões que, por sua vez, parece depender da neurogênese hipocampal (KHEIRBEK *et al.*, 2012). Além disso, tanto a porção medial do córtex pré-frontal como o hipocampo foram apontados como componentes cruciais de um circuito neural relacionado à especificidade da memória e a generalização (XU, SÜDHOF, 2013). Com base nesses dados, fica claro que um próximo passo seria investigar se a estimulação de receptores β -adrenérgicos presentes no hipocampo – ou no circuito neural em que ele faz parte – poderia induzir a superconsolidação da memória e sustentar a generalização do medo.

Além da generalização do medo, a hiperativação noradrenérgica que acontece durante a consolidação da memória resultou em um aumento na pressão arterial. O controle noradrenérgico central da pressão arterial é descrito em roedores (KUBO, MISU, 1981; CRESTANI *et al.*, 2008; SCOPINHO *et al.*, 2012), mas a possibilidade de haver alterações a longo prazo induzidas por modulação direta dessa via é pouco explorada. Embora a ioimbina cause alterações cardiovasculares de maneira direta (SOETER, KINDT, 2012), a administração dessa droga fora da janela de consolidação da memória de medo – e 6 h mais próxima do momento em que houve a mensuração da pressão sistólica – não resultou em aumentos significativos nesse

parâmetro, confirmando que o aumento na pressão parece estar atrelado à formação de uma memória disfuncional. Respostas de generalização e sensibilização locomotora induzidas por outros protocolos comportamentais são acompanhadas de aumento na pressão arterial (BRUIJNZEEL *et al.*, 2001; ZOLADZ, FLESHNER, DIAMOND, 2013), supostamente associadas à formação da memória traumática por si só, indicando a relevância desse parâmetro no modelamento de memórias disfuncionais. De maneira importante, a magnitude das respostas de generalização do medo parecem se relacionar diretamente com alterações cardiovasculares em pacientes com PTSD (EHLERS *et al.*, 2010). De fato, além da gama de alterações comportamentais, o PTSD também é acompanhado de distúrbios funcionais em outros sistemas, sendo até mesmo considerado um elo entre transtornos psiquiátricos e cardiovasculares (KIBLER, 2009; COUGHLIN, 2011). Embora a hipertensão seja uma das comorbidades mais frequentes nesses pacientes (MELLMAN *et al.*, 2009; PAULUS, ARGO, EGGE, 2013), não existe uma relação causal e consequência descrita entre essas alterações cardiovasculares e a memória traumática. Ao menos no protocolo proposto, fica claro que existe uma relação direta entre a formação da memória disfuncional e a indução de alterações cardiovasculares agudas.

A sensibilização do medo também foi uma consequência do protocolo utilizado, observada pelo aumento da esQUIVA inibitória no LCE no grupo tratado com ioimbina. Essa característica também é observada em outros protocolos que supostamente induzem a formação de uma memória traumática com o uso de estímulos aversivos de alta intensidade/relevância, como a exposição ou confronto com o predador (ADAMEC, HEBERT, BLUNDELL, 2011; CAMPOS *et al.*, 2013a; 2013b). De maneira interessante, a sensibilização parece ser uma consequência comportamental diretamente relacionada à formação de uma memória traumática (ADAMEC *et al.*, 2006), havendo a participação crucial das vias noradrenérgicas para o seu surgimento (ADAMEC *et al.*, 2007; OLSON *et al.*, 2011; CORLEY, CARUSO, TAKAHASHI, 2012). Mesmo que a sensibilização seja uma das características observadas no PTSD (DYKMAN, ACKERMAN, NEWTON, 1997; ANISMAN, 2011), outros transtornos de ansiedade compartilham desse sintoma, como a ansiedade generalizada e o transtorno do pânico (ROSEN, SCHULKIN, 1998; UYS *et al.*, 2003). Por isso, a utilização da sensibilização como parâmetro útil na caracterização de um modelo experimental para uma memória traumática tipo-PTSD acaba tendo pouco destaque quando comparada às

características mais evidentes e restritas desse transtorno, como a generalização do medo.

3.6 CONCLUSÕES

Frente à hiperativação noradrenérgica, a memória de medo foi consolidada de maneira aberrante (*i.e.*, superconsolidada, como será assumido de agora em diante), ocorrendo generalização do medo duradoura, maior resistência a intervenções comportamentais (extinção) ou farmacológicas (com agentes antiaversivos ou bloqueadores da reconsolidação), além de outras características como sensibilização das respostas defensivas e aumento na pressão arterial. Como todo esse perfil pôde ser induzido por meio da administração sistêmica de ioimbina, uma droga de baixo custo, associada ao protocolo de condicionamento de medo contextual, pode-se destacar a relevância e utilidade desse protocolo na pesquisa translacional. Seu uso parece mais interessante que a adoção de protocolos de condicionamento de medo isoladamente quando o objetivo é modelar um fenótipo tipo-PTSD confiável ou triar/desenvolver intervenções potencialmente úteis para atenuar essas respostas, como a intervenção dual visando à desestabilização e prejuízo da reconsolidação da memória demonstrada aqui, ou ainda alternativas para aumentar a eficiência da extinção. De maneira importante, a indução da generalização do medo parece depender da ativação de receptores β -adrenérgicos localizados no sistema nervoso central.

4

O envolvimento hipocampal na generalização do medo: além da transmissão noradrenérgica

*“A diferença entre as memórias falsas e as verdadeiras é a
mesma das joias: sempre são as falsas que parecem
as mais reais, as mais brilhantes.”*

— Salvador Dali

4.1 INTRODUÇÃO

Algumas características disfuncionais relacionadas às memórias traumáticas do PTSD são estudadas tradicionalmente, mas a generalização do medo, que se desenvolve com frequência nesses pacientes (KLEIM, EHLERS, 2008; JOVANOVIĆ *et al.*, 2009; FLEURKENS, RINCK, VAN MINNEN, 2011; JOVANOVIĆ *et al.*, 2012; KOSTEK *et al.*, 2014; NORRHOLM *et al.*, 2014; LEVY-GIGI *et al.*, 2015), se tornou foco de interesse mais recentemente. Como essa característica parece ser relevante para o entendimento de memórias disfuncionais em humanos, vários grupos têm somado esforços em aprofundar o conhecimento sobre isso. No entanto, a neurobiologia do desenvolvimento dessa característica ainda não foi completamente elucidada. O PTSD é relacionado com a disfunção de diversas estruturas encefálicas, incluindo o córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo (para revisão, ver PITMAN *et al.*, 2012; PARSONS, RESSLER, 2013; ZOLADZ, DIAMOND, 2013). Tanto a porção medial do córtex pré-frontal quanto o hipocampo e, mais recentemente, a amígdala, têm sido apontados como componentes cruciais de um circuito neural relacionado à especificidade da memória e generalização (XU, SÜDHOF, 2013; GHOSH, CHATTARJI, 2015). Como estudos recentes indicam que alterações funcionais na porção posterior do hipocampo (homólogo ao hipocampo dorsal em roedores) teriam uma correlação muito maior com o PTSD do que com outros transtornos de ansiedade (CHEN, ETKIN, 2013), além da função tradicional dessa estrutura na formação das memórias (FANSELOW, 2000), o envolvimento hipocampal na generalização de medo é uma possibilidade a ser investigada.

4.1.1 O hipocampo dorsal como figura central na formação das memórias

A ideia de que o hipocampo teria uma função fundamental no processamento das memórias não é nova, sendo até designado como o ‘mapa cognitivo’ cerebral (O’KEEFE, NADEL, 1978). Embora ele exerça um papel dual no controle de aspectos cognitivos e emocionais, existe uma dissociação anatômica e funcional clara ao longo do seu eixo longitudinal: enquanto os processos emocionais são mais relacionados à sua porção ventral (homóloga ao hipocampo anterior em humanos), o hipocampo dorsal (HD) é o grande responsável pelo processamento das memórias (FANSELOW, DONG, 2010).

A capacidade proeminente de processamento das memórias pode ser atribuída, em parte, à organização funcional do hipocampo em um circuito trisináptico (**Fig. 32**) que permite alta eficiência na recepção e gerenciamento de informações (NEVES, COOKE, BLISS, 2008). Através da via perforante, o córtex entorrinal envia projeções que transmitem informações sensoriais polimodais às células granulares do giro denteado. Projeções axonais (fibras musgosas) enviam tais informações às células piramidais da região CA3, que as retransmitem para a região CA1 via projeções colaterais de Schaffer. A informação pode, então, ser enviada a outras regiões – como o córtex pré-frontal – ou sofrer processamento próprio na CA1, que apresenta alta densidade de ‘células de local’ (*place cells*), capazes de codificar informações espaciais (O’KEEFE, NADEL, 1978). Por conta desse circuito relativamente simples, as vias hipocâmpais constituem um dos melhores sistemas experimentais para o estudo dos mecanismos de plasticidade sináptica relacionados ao armazenamento de memórias, o que justifica o fato da LTP ter sido inicialmente descrita em fatias de hipocampo (BLISS, LØMO, 1973).

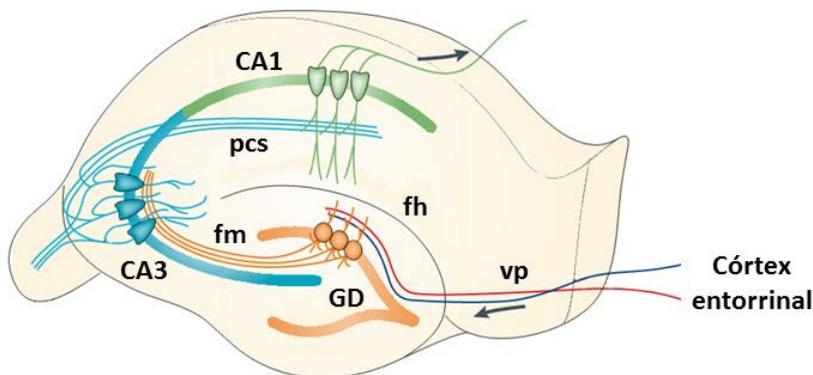


Figura 32. O circuito trisináptico de fluxo de informação. GD, giro denteado; vp, via perforante; fh, fissura hipocampal; fm, fibras musgosas; pcs, projeções colaterais de Schaffer (adaptado de NEVES, COOKE, BLISS, 2008).

A participação do HD no processamento das memórias é evidente, especialmente em testes comportamentais que apresentem componentes espaciais, como o condicionamento de medo contextual (FANSELOW, 2000). Uma atenção especial é dada ao envolvimento do HD durante a consolidação da memória, função classicamente atribuída à estrutura (O’KEEFE, NADEL, 1978; IZQUIERDO, MEDINA, 1997; NADEL, MOSCOVITCH, 1997; FANSELOW, 2000; NADEL,

BOHBOT, 2001; MORGADO-BERNAL, 2011). De maneira geral, é possível estimar a participação hipocampal na formação das memórias por meio da expressão de proteínas relacionadas à plasticidade neuronal. O Arc (do inglês, ‘*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*’) é uma proteína de função estrutural com expressão imediata frente a eventos que levam à plasticidade neuronal (KORB, FINKBEINER, 2011; SHEPHERD, BEAR, 2011), com atividade relacionada ao remodelamento sináptico e tráfego de receptores glutamatérgicos (BRAMHAM *et al.*, 2008; 2010). Por conta disso, a expressão desse gene é implicada diretamente na formação das memórias (TZINGOUNIS, NICOLL, 2006), sendo útil para a determinação de um mapa de estruturas encefálicas envolvidas no seu processamento (SAUVAGE, NAKAMURA, BEER, 2013). A expressão aumentada de Arc no HD após o aprendizado reforça a participação dessa estrutura na consolidação das memórias (GUZOWSKI *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2005; PLATH *et al.*, 2006; GRANADO *et al.*, 2008; CZERNIAWSKI *et al.*, 2011).

Como o HD recebe projeções do córtex pré-frontal medial, hipocampo ventral e amígdala (VERTES, 2006; FANSELOW, DONG, 2010), a capacidade de eventos emocionais em potencializarem as memórias de medo dependentes do hipocampo é evidente (MALIN, MCGAUGH, 2006; HERMANS *et al.*, 2014). Essa ideia é substanciada por trabalhos que demonstram a potencialização da LTP no HD após a ativação de estruturas modulatórias, como a amígdala basolateral (IKEGAYA *et al.*, 1997; ABE, 2001), além do aumento na expressão de Arc hipocampal nesses casos (MCINTYRE *et al.*, 2005; PLATH *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2011; MCREYNOLDS *et al.*, 2010). O hipocampo também recebe projeções do *locus coeruleus*, que constitui a única fonte de noradrenalina nessa estrutura cortical (SVED *et al.*, 2002), permitindo que a modulação noradrenérgica priorize a participação hipocampal no processamento das memórias aversivas (GOOSENS, 2011). Após eventos aversivos, como choques elétricos ou imobilização, é observado o aumento da liberação de noradrenalina no hipocampo de ratos (ABERCROMBIE, KELLER, ZIGMOND, 1988), havendo uma relação direta com a intensidade da memória formada (GUZOWSKI *et al.*, 2001; GRANADO *et al.*, 2008). A modulação noradrenérgica no HD na formação das memórias é evidente, efeito que parece ser dependente da ativação de receptores β -adrenérgicos em roedores (JOËLS, BARAM, 2009) e humanos (SCHWABE *et al.*, 2012).

4.1.2 Os diferentes subtipos de receptores β -adrenérgicos no hipocampo

Os receptores β -adrenérgicos são atualmente classificados em β_1 , β_2 e β_3 (BYLUND, 2007). Embora os receptores β_1 -adrenérgicos tenham funções melhor estabelecidas no processamento das memórias (JURGENS *et al.*, 2005; QU, GUO, LI, 2008; JOËLS, BARAM, 2009; MARZO, BAI, OTANI, 2009; DO-MONTE *et al.*, 2010; ZARRINDAST *et al.*, 2012; HAGGERTY *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013; COUTELLIER, ARDESTANI, SHAMLOO, 2014), alguns estudos sugerem a participação de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos nesse processo (GIBBS, SUMMERS, 2000; 2005). Ironicamente, mesmo que todos os subtipos de receptores β -adrenérgicos sejam expressos no hipocampo (SUMMERS *et al.*, 1995; NICHOLAS, HÖKFELT, PIERIBONE, 1996; HILLMAN *et al.*, 2005), os receptores β_1 -adrenérgicos são os menos expressos nessa estrutura em comparação aos demais (GIBBS, SUMMERS, 2000) (**Quadro 1**). Além disso, a afinidade da noradrenalina por esses receptores é bastante distinta (ZHANG, OUYANG, THOMAS, 2004), sendo que os receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos só seriam ativados de maneira eficiente frente a concentrações muito mais elevadas desse neurotransmissor.

Quadro 1. Diferenças quanto à expressão, afinidade e potência dos subtipos de receptores β -adrenérgicos no hipocampo de ratos.

	β_1	β_2	β_3
Expressão de RNAm no hipocampo ¹	+ -	+	++
Kd (nM do radioligante) ²	0,03	0,04	1,0
EC50 (μM de noradrenalina) ³	0,36	3,4	1,0

¹Expressão qualitativa de RNAm detectado por hibridização *in situ* no hipocampo de ratos; +- indica quantidades-traço e + ou ++ indicam o nível de detecção do RNAm (GIBBS, SUMMERS, 2000); ²Constante de dissociação (Kd) frente ao radioligante [¹²⁵I]-iodocianopindolol, um parâmetro inversamente proporcional à afinidade, em receptores β -adrenérgicos clonados de camundongos, (ZHANG, OUYANG, THOMAS, 2004); ³Concentração necessária para obter 50% do efeito máximo (EC₅₀), um indicativo da potência dos receptores β -adrenérgicos clonados de camundongos em alterar os níveis de AMPc, frente à ativação com noradrenalina (ZHANG, OUYANG, THOMAS, 2004).

Embora seja aceito que os receptores β -adrenérgicos são acoplados a proteínas G_s (BYLUND, 2007), essa regra pode não ser aplicável em todos os casos. Já que a ativação de receptores β_2 -adrenérgicos no hipocampo é relacionada ao prejuízo da evocação de memórias por meio do recrutamento da proteína G_i (SCHUTSKY, OUYANG, THOMAS, 2011). De maneira análoga, os receptores β_3 -adrenérgicos também podem se acoplar tanto à proteína G_s quanto à G_i , ao menos periféricamente (HUTCHINSON *et al.*, 2002). Embora o papel dos receptores β_2 -adrenérgicos para o processamento das memórias seja descrito (HILLMAN, DOZE, PORTER, 2005; JOINER *et al.*, 2010; QIAN *et al.*, 2012; DANG *et al.*, 2014; LAING, BASHIR, 2014), o conhecimento sobre os receptores β_3 -adrenérgicos nesse caso é muito mais restrito. Como há até pouco tempo esses receptores eram tidos como expressos exclusivamente na periferia, os estudos que determinaram a sua expressão central ainda são iniciais (RODRIGUEZ *et al.*, 1995; SUMMERS *et al.*, 1995; FÜLLHASE *et al.*, 2011), com poucos trabalhos implicando a sua participação no processamento de memórias, em aves (GIBBS, SUMMERS, 2000; GIBBS *et al.*, 2010).

Além de diferenças com relação ao recrutamento de proteínas G pelos subtipos de receptores β -adrenérgicos, as divergências podem se estender às vias de transdução de sinal. Periféricamente, tanto os receptores β_2 - quanto β_3 -adrenérgicos são associados à via do óxido nítrico (NO), havendo a liberação desse mediador gasoso (CALVERT, LEFER, 2013; CONTI *et al.*, 2013). O NO é um transmissor atípico com função retrógrada que apresenta papel importante na comunicação sináptica durante eventos plásticos relacionados à formação da memória (MEDINA, IZQUIERDO, 1995; EDWARDS, RICKARD, 2007; ZINN *et al.*, 2009; JOHNSTONE, RAYMOND, 2011). A síntese do NO no cérebro depende da atividade da forma neuronal da óxido nítrico sintase (nNOS), que apresenta expressão significativa no hipocampo (CHIANG *et al.*, 1994; WENDLAND *et al.*, 1994; IWASE *et al.*, 1998), especialmente na sua porção dorsal (LIU *et al.*, 2003), justificando a importância desse mediador na formação de memórias hipocampo-dependentes (SHEN *et al.*, 2012a; MOOSAVI *et al.*, 2014). O envolvimento nitrérgico também é claro no processamento de memórias aversivas, como as que utilizam pistas olfatórias (PAVESI, HELDT, FLETCHER, 2013), esquivas inibitória (HAROONI *et al.*, 2009; ZINN *et al.*, 2009) ou àquelea relacionada ao sobressalto potencializado pelo medo (OVEREEM, KOKKINIDIS, 2012). Embora o NO seja crucial para a formação de memórias de medo associadas ao som (SCHAFFER *et al.*, 2005; OTA *et al.*, 2008; OVEREEM *et al.*, 2010), as memórias

contextuais parecem ser mais dependentes da transmissão nitrérgica (KELLEY *et al.*, 2009). O efeito do NO é mediado pela ativação da guanilil ciclase solúvel (GCs), culminando com aumento nas concentrações intracelulares de GMPc, cuja importância no processamento das memórias já é bem estabelecido (PRICKAERTS *et al.*, 2004; KLEPPISCH, FEIL, 2009; GIESE, MIZUNO, 2013) (Fig. 33).

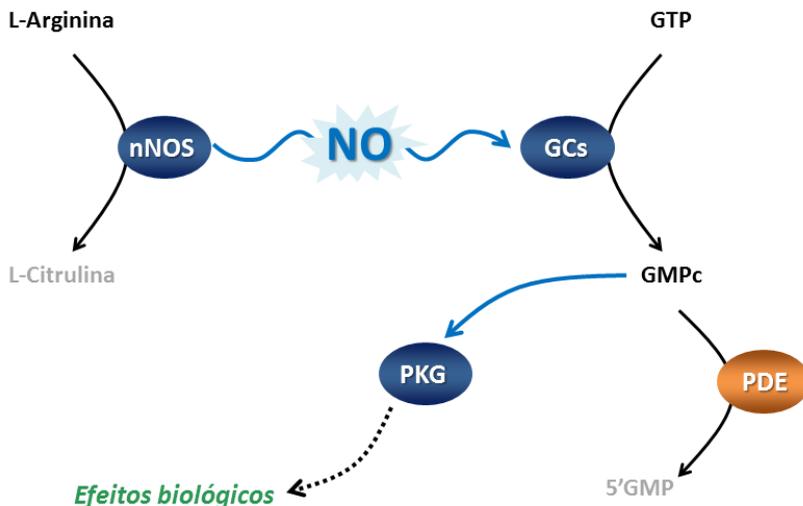


Figura 33. A via do óxido nítrico. nNOS, óxido nítrico sintase neuronal; GCs, guanilil ciclase solúvel; GTP, guanosina trifosfato; GMPc, guanosina 3',5'-monofosfato cíclico; PKG, proteína quinase ativada pelo GMPc; PDE, fosfodiesterases.

Em conjunto, levando em conta a possibilidade de haver um recrutamento de subtipos específicos de receptores β -adrenérgicos frente à formação de memórias aversivas de grande magnitude, além do possível envolvimento da via nitrérgica nos efeitos induzidos pela ativação desses receptores, a investigação mais detalhada do envolvimento deles no hipocampo dorsal é importante para o melhor entendimento dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento da generalização do medo.

4.2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

Uma vez que o recrutamento central de receptores β -adrenérgicos é necessário para indução de generalização do medo, a hipótese dessa etapa do trabalho é que o hipocampo dorsal seria uma estrutura chave na formação dessa memória inapropriada, sendo que a ativação noradrenérgica dessa estrutura, especificamente, poderia ser suficiente para induzir a generalização do medo.

4.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral foi avaliar e caracterizar a participação da transmissão noradrenérgica no HD para a indução da generalização do medo.

4.2.1.1 *Objetivos específicos*

- Avaliar a expressão de Arc no HD frente à facilitação da memória de medo contextual com ioimbina;
- Investigar o efeito da estimulação direta de receptores adrenérgicos hipocâmpais sobre a generalização do medo;
- Caracterizar o envolvimento de subtipos específicos de receptores β -adrenérgicos hipocâmpais na indução da generalização do medo;
- Avaliar o recrutamento da via nitrérgica consequente da ativação de receptores β -adrenérgicos para a indução da generalização do medo, bem como o envolvimento de subtipos específicos de receptores β -adrenérgicos nesse caso;
- Avaliar se estimulação nitrérgica hipocâmpal é suficiente, por si só, para induzir a generalização do medo.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Animais

Foram utilizados 355 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, com 3 a 4 meses de idade e peso entre 270 e 350 g. Os animais foram mantidos em condições idênticas às descritas anteriormente (seção 2.3.1, pág. 51), com aprovação do comitê de ética para o uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (71/CEUA/PRPE/2012-PP766).

4.3.2 Drogas

Cloridrato de ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg; Tocris, EUA) foi dissolvido em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) e administrado sistemicamente (i.p.) em um volume de 1,0 ml/kg.

Para microinjeções no hipocampo dorsal, foram utilizados: noradrenalina (NOR; 1,0 µg/hemisfério; Sigma-Aldrich, EUA), cloridrato de isoproterenol (ISO; 10 nmol/hemisfério; Sigma-Aldrich, EUA), cloridrato de clenbuterol (CBT; 1,0 µg/hemisfério; Sigma-Aldrich, EUA), CL316243 (CL; 1,0 µg/hemisfério; Tocris, EUA), (RS)-atenolol (ATE; 40 nmol/hemisfério; Sigma-Aldrich, EUA), cloridrato de butoxamina (BUT; 10 nmol/hemisfério; Sigma-Aldrich, EUA), SR59230A (SR; 10 nmol/hemisfério; Sigma-Aldrich, EUA), 7-nitroindazol (7NI; 1,0 µg/hemisfério; Sigma-Aldrich, EUA), ODQ (0,187 µg/hemisfério; Sigma-Aldrich, EUA), nitroprussiato de sódio (NPS; 0,06 µg/hemisfério; Sigma-Aldrich, EUA), L-arginina (L-ARG; 0,025 µg/hemisfério; Sigma-Aldrich, EUA), citrato de sildenafil (SIL; 1,0 nmol/hemisfério; Gamma, China) ou 8-Br-GMPc (1,25 µg/hemisfério; Sigma-Aldrich, EUA). As doses utilizadas foram baseadas em experimentos piloto ou trabalhos da literatura (HUANG, LEE, 1995; BERNABEU *et al.*, 1996; DO-MONTE *et al.*, 2010; PAVESI, CANTERAS, CAROBREZ, 2011; SHEN *et al.*, 2012a; ZHOU *et al.*, 2013). As drogas foram dissolvidas em solução salina tamponada com fosfato (PBS), com exceção do SR59230A, 7NI e ODQ, que foram dissolvidos em PBS contendo 15% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich, EUA) e 5% de Tween 80[®] (Sigma-Aldrich, EUA). Todas as soluções foram administradas bilateralmente no hipocampo dorsal no volume de 0,5 µl/hemisfério.

4.3.3 Condicionamento contextual de medo

O condicionamento de medo contextual foi realizado como descrito nas seções 2.3.3 (pág. 52) e 3.3.3 (pág. 95). A maior diferença se deu com relação à sessão de treino: na maioria dos casos, o treino forte, com **três choques elétricos nas patas (1,0 mA, 60 Hz, por 3 s, com 30 s de intervalo entre os choques)**, foi adotado. A intensidade de choque de 1,0 mA foi utilizada em animais submetidos a cirurgia estereotáxica, para alcançar o mesmo perfil comportamental observado em animais *naïve*. Quando o treino fraco foi utilizado, apenas um choque (1,0 mA) foi utilizado. No experimento 4.4.1, em que não houve cirurgia estereotáxica, o padrão de 0,7 mA foi mantido.

As interferências farmacológicas aconteceram imediatamente após a sessão de treino, na intenção de modular a etapa de consolidação da memória de medo contextual. A re-exposição ao Contexto A (Teste A) e exposição ao Contexto B (Teste B) foram realizadas nos dias subsequentes. Todas as sessões foram espaçadas entre si por um período de 24 h. Variações no protocolo geral e particularidades do treino adotado são apontadas durante a descrição dos resultados, quando necessário.

4.3.4 Análise da expressão de Arc

4.3.4.1 Perfusão intracardíaca e preparação do tecido cerebral

Noventa minutos após a sessão de treino forte do condicionamento contextual de medo e administração sistêmica de veículo ou ioimbina, os animais receberam uma solução anestésica contendo cloral hidratado 15% p/v (2,3 mg/ml/kg; Vetec, Brasil) e xilazina (10 mg/ml/kg; Xilazin[®], Syntec Ltda., Brasil) por via sistêmica (i.p.), seguida da perfusão intracardíaca, inicialmente com solução de sacarose 9,25% (250 ml/rato), e depois com solução de paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M (pH 7,4; 250 ml/rato), ambas a 4 °C. Os encéfalos foram retirados e conservados em solução de paraformaldeído 4% por 24 h, posteriormente transferidos para solução de sacarose 20%, no mínimo 48 h antes da realização dos cortes histológicos. Cortes seriados (8 cópias, 40 µm de espessura) foram obtidos em um criostato (Leica CM 1850, Alemanha) a uma temperatura aproximada de -20 °C e mantidos em solução anticongelante (propilenoglicol 32,6% e sacarose 18,7% em PBS) para processamento posterior. Adicionalmente, encéfalos foram coletados de um grupo de ratos *naïve*, não submetidos ao protocolo de condicionamento ou injeções, servindo como controle geral do experimento.

4.3.4.2 Reação imunohistoquímica para Arc

As secções foram tratadas com H₂O₂ 1,0% em metanol (30 min), para redução da atividade da peroxidase endógena. Após lavagens (3 x 5 min) em PBS contendo 0,15% de Triton-X100 (PBS-X), as secções foram incubadas com albumina sérica bovina (BSA) 1,0% em PBS-X (20 min) para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-Arc (1:500 em BSA 1,0%; Santa Cruz Biotechnology, EUA) a 4 °C *overnight*. Após a incubação, as secções foram novamente

lavadas em PBS-X (3 x 5 min) antes de serem incubadas com o anticorpo secundário biotinizado (1:200 em PBS-X; IgG de cabra, anti-coelho; Santa Cruz Biotechnology, EUA) por 90 min. Após remover o anticorpo secundário excedente, as secções foram lavadas com PBS-X (3 x 5 min) e incubadas com o complexo ABC avidina-biotina-peroxidase (1:500 em PBS-X; Vector Laboratories, EUA) por 2 h. A revelação (5~10 min) foi feita utilizando uma solução de tetracloro de 3'3'-diaminobenzidina (DAB 0,02%, Sigma Aldrich, EUA) contendo 0,03% de sulfato de níquel hexahidratado e cloreto de amônio. Finalmente, as lâminas foram progressivamente desidratadas com etanol (70, 90 e 100%), diafanizadas com xilol, montadas com resina sintética (DPX[®] '*mountant for histology*', Sigma Aldrich, EUA) e cobertas com lamínulas.

4.3.4.2 Regiões de interesse e quantificação de células positivas para Arc

Secções contendo o hipocampo dorsal (3,6-4,16 mm posterior ao bregma) foram selecionadas utilizando a objetiva de 10x de microscopia óptica (Eclipse 50i; Nikon, EUA). A quantificação de células positivas para Arc foi realizada manualmente em toda a extensão das camadas CA1, CA2, CA3, CA4 e giro denteado (GD), considerando apenas células com marcação claramente delimitada. Para cada encéfalo, a quantificação foi realizada em triplicata e a média foi calculada. Os resultados foram expressos como o número absoluto ou relativo (em relação ao grupo *naïve*) de células positivas para Arc. Adicionalmente, imagens das secções foram capturadas apenas para fins ilustrativos.

4.3.5 Procedimentos para injeção central

4.3.5.1 Cirurgia estereotáxica

Para anestesia, cada animal recebeu injeção intraperitoneal (i.p.) de uma solução de quetamina (100 mg/ml/kg; Cetamin[®], Syntec Ltda., Brasil) e xilazina (10 mg/ml/kg; Xilazin[®], Syntec Ltda., Brasil). O animal foi posicionado no aparelho estereotáxico, deixando a superfície do crânio paralela ao plano horizontal. A assepsia foi realizada com uma solução de álcool iodado (2%), com posterior injeção de uma solução anestésica de lidocaína 3% com adrenalina 1:50.000 (Lidostesim[®], Dentsply Pharmaceutical, Brasil) por via subcutânea (s.c.). O corte da pele acima do crânio do animal permitiu a raspagem do periósteo para a exposição do crânio e das suturas lambdóide e coronal. Um parafuso de

aço inoxidável foi fixado ao crânio após perfuração com uma broca odontológica.

O atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (2009) foi utilizado para a obtenção das coordenadas referentes ao HD (3,6 mm posterior ao Bregma, \pm 2,5 mm relativo ao eixo lateral e -2,0 mm relativo ao eixo dorso-ventral). Duas cânulas-guia, confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (22 G1; 25,0 x 7,0 mm) ajustadas para um comprimento de 11,0 mm, foram implantadas bilateralmente, permanecendo 1,3 mm acima do HD. A área exposta recebeu uma camada de acrílico odontológico auto-polimerizável de secagem rápida para integrar e ancorar todas as peças em uma prótese sólida presa ao crânio. Em cada uma das cânulas foi inserido um fio de aço inoxidável (nº 30) para reduzir a obstrução. Cada animal recebeu uma injeção (s.c.) de flunixin meglumina (2,5 mg/kg; Schering-Plough, Brasil), um agente analgésico, antipirético e anti-inflamatório, sendo mantidos em ambiente aquecido para evitar hipotermia causada pela anestesia. Em seguida, foram levados ao biotério, onde permaneceram entre 7 a 10 dias para recuperação até a realização dos experimentos.

4.3.5.2 *Microinjeção intrahipocampal*

A microinjeção bilateral no HD foi realizada com agulhas medindo 12,3 mm, confeccionadas a partir de agulhas gengivais (30 G curta). Elas foram conectadas a um tubo de polietileno (PE10; Clay Adams, EUA) acoplado a uma microseringa (Hamilton, EUA) preenchida com água destilada, deixando uma bolha de ar interposta à solução a ser injetada, facilitando a visualização do deslocamento da solução durante a infusão da droga. No momento da microinjeção o animal foi imobilizado, o fio de aço retirado com um alicate e a cânula foi desobstruída com uma lima odontológica (K-FILE Colorinox® A012D, Dentsply Ind. Com. Ltda., Brasil) de 11,0 mm. As agulhas foram introduzidas nas cânulas e, com auxílio de uma bomba de infusão (Insight, Brasil), cada animal recebeu 0,5 μ l das soluções por hemisfério hipocampal simultaneamente, infundida durante 60 s. Após a injeção, a agulha foi mantida por 30 s adicionais para reduzir o fluxo retrógrado da solução.

4.3.5.3 *Análise histológica*

Ao término dos experimentos, os animais receberam uma solução anestésica contendo cloral hidratado (30% p/v; 3 ml/animal; Vetec, Brasil) sistemicamente (i.p.), seguida pela microinjeção central de azul

de Evans (0,2 μl /hemisfério), aplicados através das mesmas cânulas-guia. Após decapitação, os encéfalos foram retirados e conservados individualmente em solução de formalina 10% por, pelo menos, 24 h, e posteriormente transferidos para solução de sacarose 20% por, no mínimo, 48 h antes da realização dos cortes histológicos. Para a verificação do sítio de injeção da droga, cortes coronais (50 μm) foram obtidos utilizando um criostato (Leica CM 1850, Alemanha) a uma temperatura aproximada de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os cortes foram fixados em lâminas de vidro gelatinizadas. Após secagem, as lâminas foram coradas pelo método de Giemsa modificado (Sigma Aldrich, EUA), montadas com resina sintética (DPX[®] ‘*mountant for histology*’, Sigma Aldrich, EUA) e cobertas com lamínulas.

Imagens representativas foram capturadas com a objetiva de 4x em um microscópio óptico (Eclipse 50i; Nikon, EUA) equipado com uma câmera digital. Os cortes foram comparados a diagramas do cérebro de ratos (PAXINOS, WATSON, 2009), sendo a maioria das microinjeções realizadas no HD entre 3,6 e 4,16 mm posterior a Bregma (Fig. 34), em coordenadas anteriores ao hipocampo ventral, reduzindo a possibilidade de efeitos indiretos nessa estrutura. Apenas os animais com histologia bilateral para o HD confirmada foram incluídos na análise estatística.

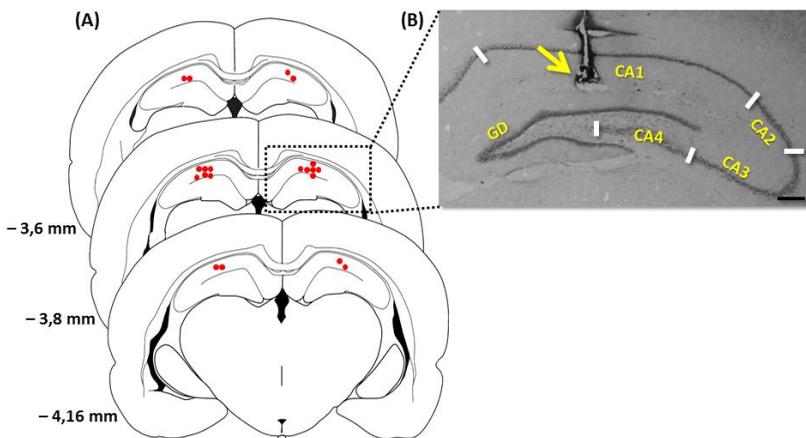


Figura 34. Análise histológica das microinjeções no hipocampo dorsal. (A) Diagramas de cortes coronais do cérebro de ratos representando os sítios de injeção no HD (pontos vermelhos). (B) Fotomicrografia (barra preta = 500 μm) do sítio de injeção (indicado pela seta) no HD (aproximadamente 3,8 mm posterior ao Bregma), com as camadas delimitadas pelas barras brancas. GD, giro dentado. (Adaptado de PAXINOS, WATSON, 2009).

4.3.6 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Após assegurar a distribuição normal das amostras, os dados foram submetidos à ANOVA de uma ou duas vias. Sempre após essas análises, foi utilizado o teste *post-hoc* de Newman-Keuls, com valor de significância estatística de $P < 0,05$, para determinar as diferenças entre os grupos. O teste “t” de Student foi adotado para a comparação de dois grupos independentes, quando necessário. Os resultados foram analisados utilizando o Statistica[®] 7 (StatSoft Inc., EUA) e representados em gráficos confeccionados com o GraphPad Prism[®] 5 (GraphPad Prism, EUA). Todos os gráficos acompanham esquemas que indicam o protocolo experimental adotado e os momentos da administração de drogas.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 A hiperativação noradrenérgica aumenta a expressão de Arc no hipocampo dorsal

Caso o HD realmente esteja envolvido no processo de superconsolidação da memória e indução da generalização do medo, seria esperado um aumento na expressão de Arc após a hiperativação noradrenérgica. A fim de avaliar essa possibilidade, 12 ratos foram alocados em 2 grupos ($n=6$ /grupo) com base no tratamento sistêmico (i.p.) com veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg), administrado logo após a sessão de treino forte. Noventa minutos após, os animais passaram por perfusão intracardíaca e tiveram os cérebros removidos para marcação imunohistoquímica para Arc no HD. Um grupo *naïve* ($n=6$), não submetido ao protocolo de condicionamento de medo ou tratamentos, também foi incluído na análise como controle geral.

A ANOVA de uma via indicou um aumento significativo na expressão de Arc na CA1 ($F_{2,15} = 23,0$; $P = 0,00003$) e CA3 ($F_{2,15} = 10,2$; $P = 0,0016$) (**Fig. 35A**). O grupo tratado com veículo apresentou uma expressão maior de Arc na CA1 em relação ao grupo *naïve*, demonstrando o envolvimento dessa camada hipocampal no condicionamento contextual de medo *per se*. Contudo, o aumento foi evidente tanto na CA1 e CA3 no grupo tratado com ioimbina quando comparados aos grupos *naïve* e tratados com veículo. Nenhuma alteração significativa foi observada nas demais camadas analisadas (CA2: $F_{2,15} = 3,81$; $P = 0,06$; CA4: $F_{2,15} = 1,88$; $P = 0,186$; GD: $F_{2,15} = 0,67$; $P = 0,52$).

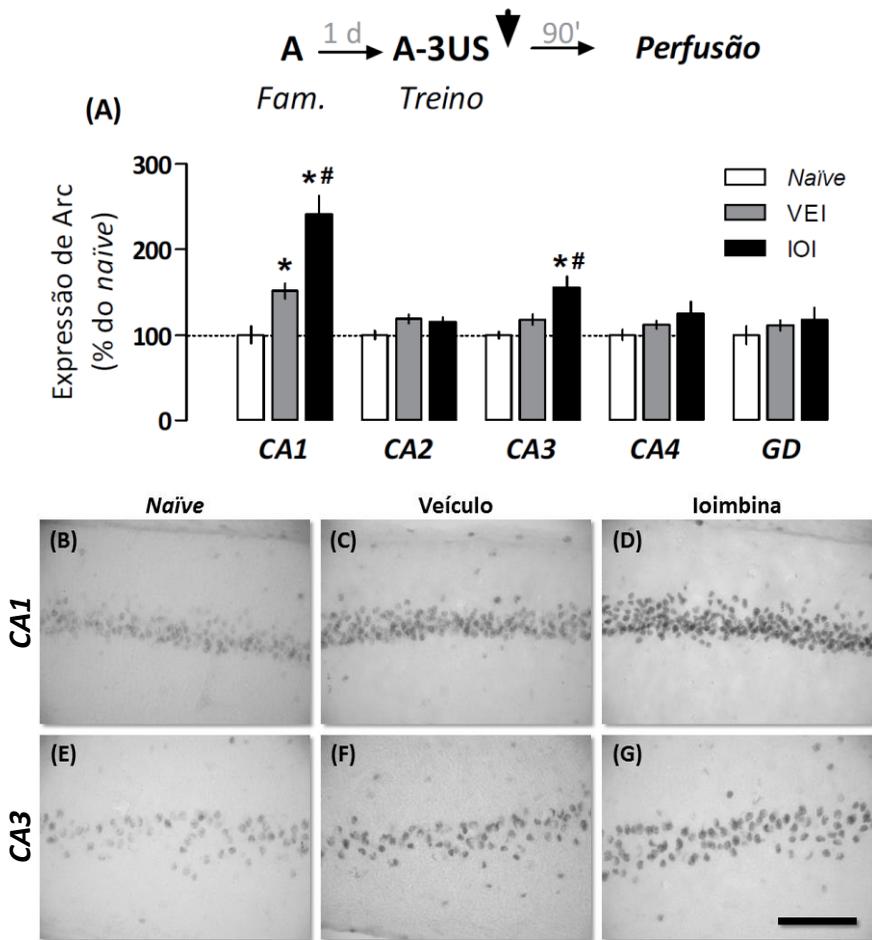


Figura 35. A superconsolidação da memória aumenta a expressão de Arc no hipocampo dorsal. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual. (A) Expressão de Arc nas camadas CA1, CA2, CA3, CA4 e giro dentado (GD) do hipocampo dorsal. A seta indica o momento do tratamento. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de aumento na expressão de células positivas para Arc em relação ao grupo *naïve*. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo *naïve* e # indica uma diferença significativa em relação ao grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

O mesmo padrão foi observado quando da análise estatística dos valores absolutos da contagem de células Arc-positivas (**Tab. 14**).

Tabela 14. Número absoluto de células positivas para Arc no hipocampo dorsal.

	Condicionados		
	<i>Naïve</i> (n=6)	Veículo (n=6)	Ioimbina (n=6)
CA1	348,5 ± 35,1	528,1 ± 31,3*	840,4 ± 76,5*#
CA2	124,3 ± 6,3	147,8 ± 6,5	143,6 ± 6,4
CA3	249,6 ± 11,0	294,5 ± 15,5	387,4 ± 32,9*#
CA4	255,6 ± 16,2	286,3 ± 11,6	319,9 ± 35,4
GD	400,1 ± 42,5	444,5 ± 25,0	470,9 ± 57,2

Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual. GD: giro denteado. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo *naïve* e # indica uma diferença significativa em relação ao grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.4.2 A estimulação de receptores β -adrenérgicos no hipocampo dorsal é suficiente para induzir generalização do medo

O recrutamento de receptores β -drenérgicos centrais é necessário para a indução da generalização do medo. Considerando a participação do HD nesse processo, a ativação desses receptores presentes nessa região encefálica poderia ser responsável pela generalização do medo. Para avaliar essa hipótese, 24 ratos foram alocados em 3 grupos (n=8/grupo) que receberam veículo, noradrenalina (1,0 μ g/hemisfério) ou o agonista não-seletivo de receptores β -adrenérgicos isoproterenol (10 nmol/hemisfério), administrado logo após a sessão de treino forte.

A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo durante o Teste B ($F_{2,21} = 41,0$; $P = 0,0000001$). A estimulação noradrenérgica no HD causou um aumento no congelamento durante a exposição ao Contexto B (**Fig. 36**), demonstrando que a ativação de receptores β -adrenérgicos nessa estrutura encefálica é suficiente para a indução da generalização do medo. Todos os grupos apresentaram níveis comparáveis de congelamento durante a exposição ao Contexto A ($F_{2,21} = 0,016$; $P = 0,98$), sem aumento da resposta condicionada frente aos tratamentos realizados.

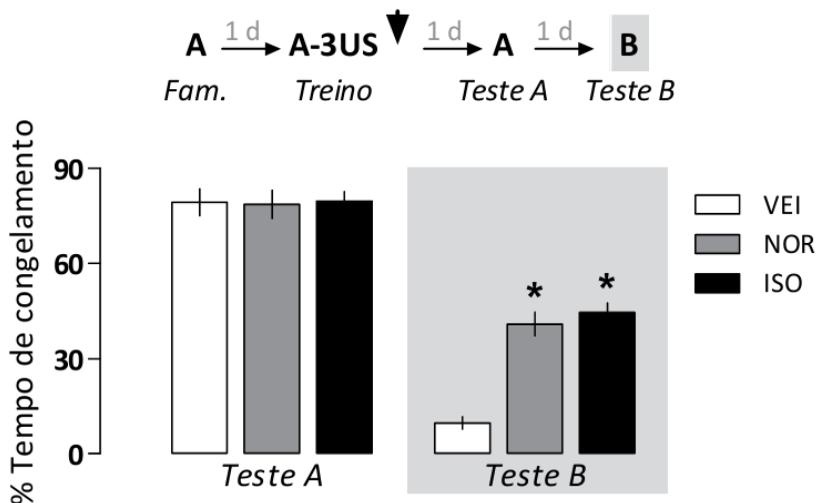


Figura 36. A estimulação de receptores β -adrenérgicos no hipocampo dorsal durante a consolidação induz a generalização do medo. Veículo (VEI), noradrenalina (NOR; 1,0 μ g/hemisfério) ou o agonista não-seletivo de receptores β -adrenérgicos isoproterenol (ISO; 10 nmol/hemisfério) foram administrados no hipocampo dorsal logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual. A seta indica o momento do tratamento. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Como não houve aumento na expressão de congelamento frente ao contexto pareado no experimento anterior, pode haver controvérsias ao se assumir que a generalização do medo seria fruto da potencialização da consolidação frente a interferências centrais. Embora esse perfil de resultado tenha sido justificado previamente como consequência de um nível máximo desse comportamento, um experimento adicional visou comprovar que a estimulação noradrenérgica do HD seria capaz de potencializar a consolidação da memória. Para tanto, 17 ratos foram alocados em dois grupos ($n=8-9$ /grupo) que receberam veículo ou isoproterenol (10 nmol/hemisfério) no HD imediatamente após o treino fraco, com a aplicação de apenas um choque elétrico (1,0 mA). A estimulação noradrenérgica aumentou o tempo de congelamento apenas frente ao Contexto A (Tab. 15), sustentando a ideia de que os efeitos observados anteriormente pela

estimulação noradrenérgica se devem, de fato, pela facilitação na consolidação da memória de medo.

Tabela 15. A estimulação de receptores β -adrenérgicos do hipocampo dorsal potencializa a consolidação da memória de medo contextual fraca.

	Veículo (n=8)	Isoproterenol (n=9)	Análise estatística
Teste A	22,5 \pm 2,0	66,2 \pm 4.9*	$t_{15} = 62,5; P = 0,000001$
Teste B	9,0 \pm 1,5	10,3 \pm 1,2	$t_{15} = 0,48; P = 0,50$

Veículo ou isoproterenol (10 nmol/hemisfério) foram administrados no hipocampo dorsal logo após a sessão de treino fraco do condicionamento contextual. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste “t” de Student para grupos independentes).

4.4.3 A generalização do medo depende da ativação de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos no hipocampo dorsal

Para caracterizar o recrutamento de subtipos específicos de receptores β -adrenérgicos necessários para induzir a generalização do medo, 64 ratos foram alocados em 8 grupos (n=8/grupo) que receberam veículo, o antagonista seletivo de receptores β_1 atenolol (40 nmol/hemisfério), o antagonista seletivo de receptores β_2 butoxamina (10 nmol/hemisfério) ou o antagonista seletivo de receptores β_3 SR59230A (10 nmol/hemisfério) no HD logo após a sessão de treino forte. Imediatamente após a injeção central, os animais receberam veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg) sistemicamente (i.p.).

A ANOVA de duas vias indicou um efeito do tratamento central ($F_{3,56} = 16,2; P = 0,0000001$) e sistêmico ($F_{1,56} = 68,4; P = 0,0000001$), além de uma interação significativa entre esses fatores ($F_{3,56} = 14,7; P = 0,0000001$) durante o Teste B. O tratamento sistêmico com ioimbina aumentou o congelamento frente ao Contexto B apenas nos grupos pré-tratados com veículo ou atenolol no HD, indicando generalização do medo (**Fig. 37**). Esse efeito foi prevenido nos grupos que receberam butoxamina ou SR59230A no HD, sugerindo o recrutamento de receptores β_2 e β_3 nesse caso. Todos os grupos apresentaram níveis comparáveis de congelamento durante a exposição ao Contexto A (central: $F_{3,56} = 0,17; P = 0,91$; sistêmico: $F_{1,56} = 0,49; P = 0,49$).

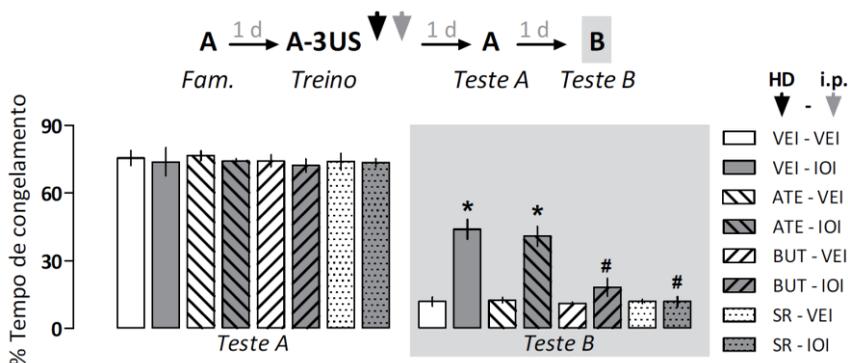


Figura 37. O bloqueio de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos hipocampais previne a generalização do medo induzida pela ioimbina. Veículo (VEI) ou os antagonistas seletivos β_1 atenolol (ATE; 40 nmol/hemisfério), β_2 butoxamina (BUT; 10 nmol/hemisfério) ou β_3 SR59230A (SR; 10 nmol/hemisfério) foram administrados no hipocampo dorsal logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual, seguida pela administração de veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.). As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle, # indica uma diferença significativa em relação ao grupo VEI-IOI (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Como contraprova para reforçar se a estimulação central de receptores β_2 e β_3 -adrenérgicos presentes no HD seria suficiente para causar generalização do medo, 28 ratos foram alocados em 3 grupos ($n=9-10$ /grupo) que receberam veículo, o agonista seletivo de receptores β_2 clenbuterol (1,0 μ g/hemisfério) ou o agonista seletivo de receptores β_3 CL316243 (1,0 μ g/hemisfério) no HD logo após a sessão de treino forte.

A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo durante o Teste B ($F_{2,25} = 130,3$; $P = 0,0000001$). A estimulação de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos no HD aumentou o congelamento durante a exposição ao Contexto B (Fig. 38), confirmando que a ativação desses receptores é suficiente para a indução da generalização do medo. Todos os grupos apresentaram níveis comparáveis de congelamento durante a exposição ao Contexto A ($F_{2,25} = 0,08$; $P = 0,92$).

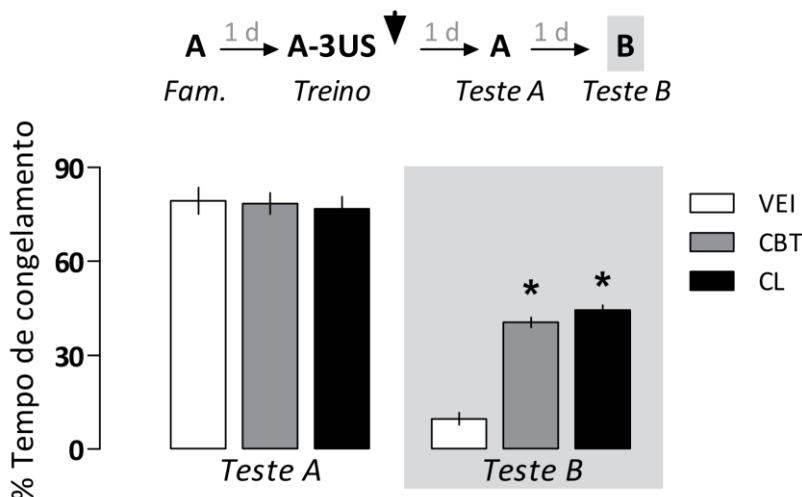


Figura 38. A estimulação de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos no hipocampo dorsal induz a generalização do medo. Veículo (VEI) ou os agonistas seletivos β_2 clenbuterol (CBT; 1,0 $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$) ou β_3 CL316243 (CL; 1,0 $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$) foram administrados no hipocampo dorsal logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual. A seta indica o momento do tratamento. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.4.4 A generalização do medo induzida pela ativação noradrenérgica depende do recrutamento da via nitrérgica no hipocampo dorsal

Receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos podem ter seus efeitos mediados pelo recrutamento de vias do NO, ao menos periféricamente (CALVERT, LEFER, 2013; CONTI *et al.*, 2013; HARTUNG, CISZEK, NACKLEY, 2014). Uma vez que a generalização do medo resulta da estimulação desses receptores, é possível que o efeito final seja mediado pelo recrutamento da via nitrérgica. Para investigar essa possibilidade, 50 ratos foram alocados em 6 grupos ($n=8-9/\text{grupo}$) que receberam veículo, o inibidor seletivo da nNOS 7-nitroindazol (1,0 $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$) ou o inibidor da GCs ODQ (0,187 $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$) no HD logo após a sessão de treino forte, seguida pela administração sistêmica (i.p.) de veículo ou ioimbina (1,0 mg/kg).

A ANOVA de duas vias indicou um efeito do tratamento central ($F_{2,44} = 14,8$; $P = 0,00001$) e sistêmico ($F_{1,44} = 33,9$; $P = 0,000001$) e uma interação significativa entre esses fatores ($F_{2,44} = 19,7$; $P = 0,000001$) durante o Teste B. A ioimbina aumentou o tempo de congelamento no grupo pré-tratado com veículo quando comparado aos respectivos controles frente ao Contexto B (**Fig. 39**). No entanto, a inibição da nNOS ou da GCs preveniram esse efeito, confirmando o envolvimento da via do NO na indução da generalização do medo. Todos os grupos apresentaram níveis comparáveis de congelamento durante a exposição ao Contexto A (pré-tratamento: $F_{2,44} = 0,56$; $P = 0,57$; tratamento: $F_{1,44} = 0,02$; $P = 0,88$).

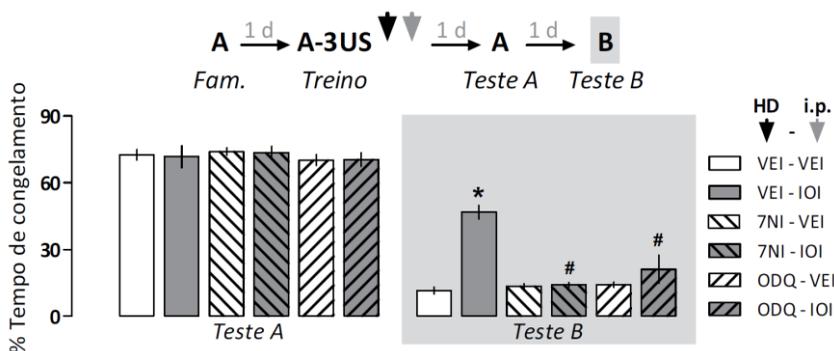


Figura 39. A generalização do medo induzida pela hiperativação adrenérgica depende da transmissão nitrérgica no hipocampo dorsal. Veículo (VEI), o inibidor da nNOS 7-nitroindazol (7NI; 1,0 $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$) ou o inibidor da guanilil ciclase solúvel ODQ (0,187 $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$) foram administrados no hipocampo dorsal logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual, seguida pela administração de veículo (VEI) ou ioimbina (IOI; 1,0 mg/kg, i.p.). As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle, # indica uma diferença significativa em relação ao grupo Vei-IOI (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Para confirmar que o recrutamento nitrérgico é consequência da ativação noradrenérgica no HD, 58 ratos foram alocados em 6 grupos ($n=9-10/\text{grupo}$) que receberam veículo ou o inibidor seletivo da nNOS 7-nitroindazol (1,0 $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$) no HD logo após a sessão de treino forte. Uma segunda infusão de veículo, noradrenalina (1,0

$\mu\text{g/hemisfério}$) ou o agonista não-seletivo de receptores β -adrenérgicos isoproterenol (10 nmol/hemisfério) foi feita no HD 5 minutos depois.

A ANOVA de duas vias indicou um efeito do pré-tratamento ($F_{1,52} = 149,3$; $P = 0,0000001$), tratamento ($F_{2,52} = 33,7$; $P = 0,0000001$) e uma interação significativa entre esses fatores ($F_{2,52} = 45,8$; $P = 0,0000001$) frente ao Contexto B. Tanto a noradrenalina quanto o isoproterenol levaram ao aumento do congelamento nos grupos pré-tratados com veículo quando comparado aos respectivos controles durante o Teste B (Fig. 40). No entanto, a inibição da nNOS preveniu o efeito da estimulação noradrenérgica, confirmando o recrutamento da via do NO pela ativação de receptores β -adrenérgicos no HD. Todos os grupos apresentaram níveis comparáveis de congelamento durante a exposição ao Contexto A (pré-tratamento: $F_{1,52} = 1,84$; $P = 0,18$; tratamento: $F_{2,52} = 0,12$; $P = 0,88$).

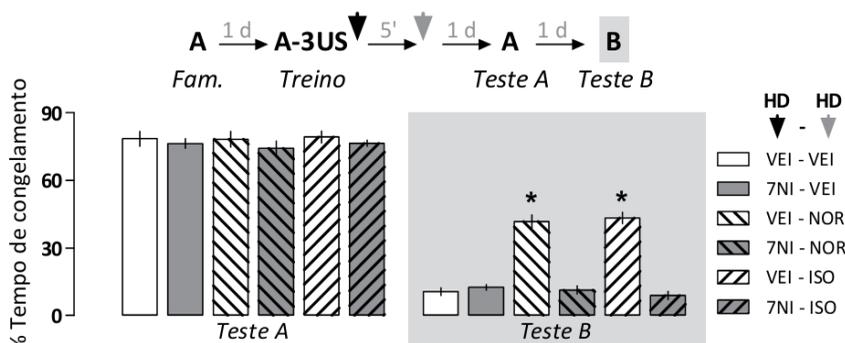


Figura 40. A ativação de receptores β -adrenérgicos no hipocampo dorsal promove o recrutamento da via nitrérgica e causa generalização do medo. Veículo (VEI) ou o inibidor da nNOS 7-nitroindazol (7NI; 1,0 $\mu\text{g/hemisfério}$) foram administrados no hipocampo dorsal logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual, seguida pela administração de veículo (VEI), noradrenalina (1,0 $\mu\text{g/hemisfério}$) ou o agonista não-seletivo de receptores β isoproterenol (10 nmol/hemisfério) 5 min depois. As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.4.5 O recrutamento nitrérgico no hipocampo dorsal é consequência da ativação de receptores β_3 -adrenérgicos

A ativação de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos hipocampais induz generalização do medo. A fim de determinar qual desses subtipos de receptores recruta a via nitrérgica, 56 ratos foram alocados em 6 grupos ($n=9-10$ /grupo) que receberam veículo ou o inibidor seletivo da nNOS 7-nitroindazol ($1,0 \mu\text{g/hemisfério}$) no HD logo após a sessão de treino forte. Uma segunda infusão de veículo, agonista seletivo de receptores β_2 clenbuterol ($1,0 \mu\text{g/hemisfério}$) ou o agonista seletivo de receptores β_3 CL316243 ($1,0 \mu\text{g/hemisfério}$) foi feita no HD 5 minutos depois.

A ANOVA de duas vias indicou um efeito do pré-tratamento ($F_{1,50} = 78,6$; $P = 0,0000001$), tratamento ($F_{2,50} = 122,2$; $P = 0,0000001$) e uma interação significativa entre esses fatores ($F_{2,50} = 61,7$; $P = 0,0000001$) durante o Teste B. Os grupos pré-tratados com veículo que receberam clenbuterol ou CL316243 fizeram mais congelamento que os respectivos controles durante a exposição ao Contexto B (**Fig. 41**). De maneira importante, somente a generalização do medo induzida pelo CL316243 foi prevenida pela inibição da nNOS, sugerindo um papel preferencial da ativação de receptores β_3 -adrenérgicos no recrutamento da via nitrérgica. Todos os grupos apresentaram níveis comparáveis de congelamento durante a exposição ao Contexto A (pré-tratamento: $F_{1,50} = 0,75$; $P = 0,39$; tratamento: $F_{2,50} = 0,20$; $P = 0,82$).

4.4.6 A ativação da via nitrérgica no hipocampo dorsal é suficiente para induzir generalização do medo

Para investigar se a ativação de vias do NO no HD induziria a generalização do medo *per se*, 40 animais foram alocados em 5 grupos ($n=8$ /grupo), que receberam infusão de veículo, o doador de NO nitroprussiato de sódio ($0,06 \mu\text{g/hemisfério}$), o precursor do NO L-arginina ($0,025 \mu\text{g/hemisfério}$), o inibidor da fosfodiesterase-5 sildenafil ($1,0 \text{ nmol/hemisfério}$) ou o análogo sintético 8-Br-GMPc ($1,25 \mu\text{g/hemisfério}$) imediatamente após a sessão de treino forte.

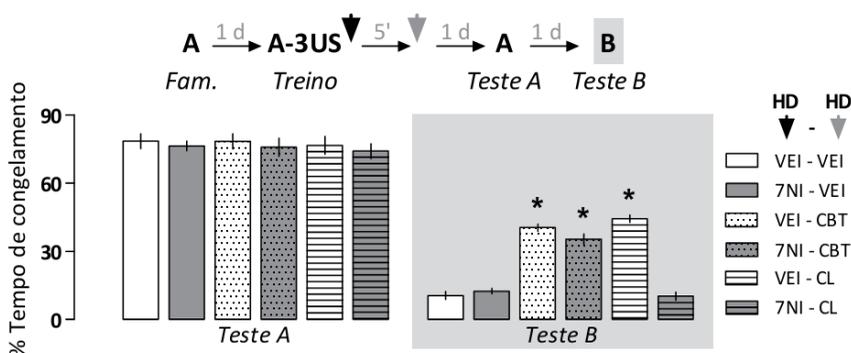


Figura 41. A ativação de receptores β_3 -adrenérgicos no hipocampo dorsal recruta a via nitrérgica e induz generalização do medo. Veículo (VEI) ou o inibidor da NOSn 7-nitroindazol (7NI; 1,0 μg /hemisfério) foram administrados no hipocampo dorsal logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual, seguida, 5 minutos após, pela administração de veículo (VEI), os agonistas seletivos β_2 clenbuterol (CBT; 1,0 μg /hemisfério) ou β_3 CL316243 (CL; 1,0 μg /hemisfério). As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo durante o Teste B ($F_{4,35} = 48,4$; $P = 0,0000001$). A estimulação da via nitrérgica no HD por todos os agentes utilizados aumentou o congelamento durante a exposição ao Contexto B (**Fig. 42**), confirmando que tanto o aumento na oferta de NO (seja pelo uso de um doador ou aumento na disponibilidade do seu precursor) quanto um aumento nas concentrações de GMPc – por meio da inibição da enzima de degradação ou fornecimento do análogo sintético – seriam suficientes para induzir a generalização do medo. Todos os grupos apresentaram níveis comparáveis de congelamento durante a exposição ao Contexto A ($F_{4,35} = 0,54$; $P = 0,70$).

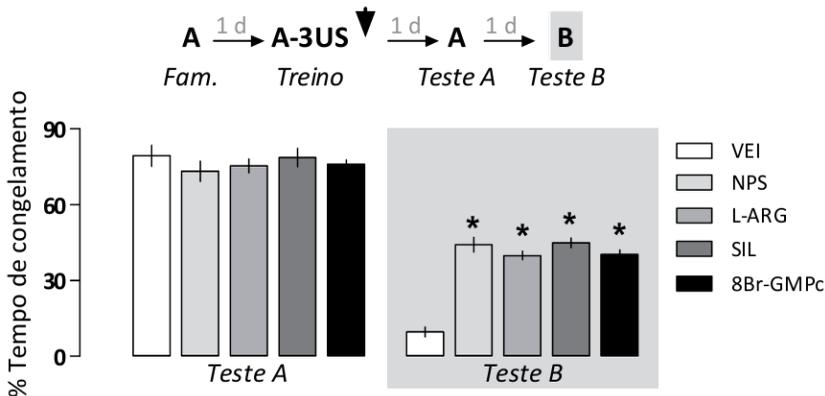


Figura 42. A estimulação da via nitrérgica hipocampal durante a consolidação induz a generalização do medo. Veículo (VEI) ou o doador de NO nitroprussiato de sódio (NPS; 0,06 $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$), o precursor do NO L-arginina (L-ARG; 0,025 $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$), o inibidor da fosfodiesterase-5 sildenafil (SIL; 1,0 nmol/hemisfério) ou o análogo sintético 8-Br-GMPc (1,25 $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$) foram administrados no hipocampo dorsal logo após a sessão de treino forte do condicionamento contextual. A seta indica o momento do tratamento. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.5 DISCUSSÃO

4.5.1 A participação de receptores β -adrenérgicos hipocampais na generalização do medo

O condicionamento de medo contextual aumentou a expressão de Arc na camada CA1 (mas não na CA2, CA3, CA4 ou GD) do HD, confirmando o recrutamento dessa estrutura para a consolidação dessa memória aversiva, como já descrito na literatura (SANDERS, WILTGEN, FANSELOW, 2003; CZERNIAWSKI *et al.*, 2011; BESNARD, LAROCHE, CABOCHE, 2014). O aumento na expressão de Arc no HD também é evidente em outras tarefas espaciais, *i.e.*, hipocampo-dependentes (GUZOWSKI *et al.*, 2001; GRANADO *et al.*, 2008). Além do hipocampo, aumentos significativos na expressão de Arc também são observados no córtex pré-frontal e na amígdala (PLOSKI *et al.*, 2008; OTA *et al.*, 2010; ZHANG, FUKUSHIMA, KIDA, 2011; CHAU *et al.*, 2013), reforçando a ocorrência de eventos plásticos que sustentariam a formação da memória aversiva envolvendo

essa circuitaria. Como essas três estruturas são as principais integrantes de um circuito neural implicado na formação e manutenção de memórias com caráter aversivo (LEDOUX, 2000; KIM, JUNG, 2006; MAREN, PHAN, LIBERZON, 2013), esses resultados confirmam a relação da expressão aumentada de Arc em estruturas necessárias para o processamento cognitivo. Inclusive, a consolidação de uma memória de medo é prejudicada quando a expressão de Arc é inibida em estruturas encefálicas relacionadas com o aprendizado (CZERNIAWSKI *et al.*, 2011; HOLLOWAY, MCINTYRE, 2011), confirmando a sua função na formação das memórias.

A hiperativação noradrenérgica durante a consolidação da memória de medo contextual induziu um aumento adicional na expressão de Arc nas camadas CA1 e CA3 do HD, um resultado que implica essa estrutura como alvo de eventos plásticos relacionados à formação da memória disfuncional. O hipocampo recebe projeções densas do *locus coeruleus* (MCNAUGHTON, MASON, 1980; HARLEY, 1991; 2007; LERANTH, HAJSZAN, 2007), justificando a modulação noradrenérgica sobre as memórias que recrutam essa estrutura. De maneira consonante, a estimulação do *locus coeruleus* potencializa as alterações plásticas hipocampais (HANSEN, MANAHAN-VAUGHAN, 2014). Como o antagonismo de receptores α_2 -adrenérgicos leva ao aumento na ativação do *locus coeruleus* (IVANOV, ASTON-JONES, 1995), o resultado obtido no presente estudo concorda com a literatura. Adicionalmente, a administração de outros antagonistas de receptores α_2 -adrenérgicos também aumenta a expressão de Arc no cérebro, verificada por hibridização *in situ*, embora esse aumento não tenha sido significativo no hipocampo (SERRES *et al.*, 2012). No entanto, a detecção de variações na expressão de RNAm não é uma evidência definitiva para comprovar diferenças na expressão da proteína, já que o aumento na síntese proteica poderia acontecer por alterações nos processos de regulação da tradução sem necessariamente alterar a transcrição, *i.e.*, sem uma correlação absoluta entre níveis de RNAm/proteína (CUTLER, 2003). De maneira importante, a maior ocorrência de eventos plásticos na CA1 do grupo tratado com ioimbina pode ser uma evidência de um processo potencializado de formação da memória, reforçando a hipótese da superconsolidação.

O aumento na expressão de Arc na CA3 apenas no grupo em que ocorreu a hiperativação noradrenérgica reforça essa hipótese: a disposição da via trissináptica hipocampal em diversas camadas neuronais heterogêneas (GD \rightarrow CA3 \rightarrow CA1) permite a amplificação dos sinais recebidos pelo córtex entorrinal ao longo dessa alça,

facilitando a ocorrência de alterações plásticas na CA1, região que apresenta grande densidade de neurônios responsáveis pelo processamento contextual (MIZUMORI *et al.*, 1999; KNIERIM, LEE, HARGREAVES, 2006). Dessa forma, como a amplificação aconteceria de maneira gradual entre as camadas hipocâmpais, alterações na plasticidade seriam inicialmente observadas de maneira significativa nas porções finais dessa via – a CA1 – antes que pudessem ser evidentes em camadas dispostas anteriormente nesse circuito, como a CA3. Uma interpretação possível para esse resultado é que a potencialização da via trissináptica hipocâmpal foi tão pronunciada frente à hiperativação noradrenérgica que o aumento de Arc foi evidente também na CA3. Existe a ideia de que, ao menos durante a evocação, a transferência da informação entre CA3 e CA1 aconteceria principalmente pela sinalização noradrenérgica (ZHANG, GUZOWSKI, THOMAS, 2005). Embora não seja definido se esse mesmo padrão aconteceria durante a consolidação da memória, a existência dessa via de modulação noradrenérgica CA3-CA1 reforça essa premissa e sustenta a interpretação quanto ao aumento na expressão de Arc na CA3. De maneira geral, os nossos resultados sugerem que a expressão aumentada de Arc pode servir como marcador para estimar a participação de estruturas encefálicas na superconsolidação da memória de medo.

Embora outras estruturas encefálicas estejam implicadas no circuito neural envolvido com a generalização do medo (GREENBERG *et al.*, 2013; XU, SÜDHOF, 2013), nossos resultados se restringem à análise do hipocampo dorsal, considerando o seu papel crítico no processamento contextual (SANDERS, WILTGEN, FANSELOW, 2003) e o fato da generalização do medo ser uma característica que parece se relacionar diretamente a alterações hipocâmpais, ao menos no PTSD (LEVY-GIGI *et al.*, 2015). De fato, a generalização do medo que ocorre em memórias remotas tem sido atribuída à maior participação do córtex pré-frontal ao longo do tempo (WILTGEN, SILVA, 2007). Contudo, deve-se atentar às possíveis diferenças mecânicas – e até mesmo neurobiológicas – que distinguiria a ocorrência da generalização do medo com o passar do tempo daquela que foi induzida, a curto prazo, por um processamento disfuncional de uma memória aversiva frente à hiperativação noradrenérgica. Como exemplo, a ativação noradrenérgica na amígdala durante a estabilização de uma memória aversiva recente foi relacionada a um prejuízo subsequente na extinção, outra característica disfuncional da memória de medo (DEBIEC, BUSH, LEDOUX, 2011), embora a possível generalização do medo não tenha sido avaliada no estudo. Como a estimulação noradrenérgica da

amígdala causa um aumento na expressão de Arc no córtex cingulado e hipocampo durante um aprendizado de caráter aversivo (HOLLOWAY-ERICKSON, MCREYNOLDS, MCINTYRE, 2012; MCREYNOLDS *et al.*, 2014) e a facilitação da LTP hipocampal *in vivo* (IKEGAYA *et al.*, 1997), pode-se imaginar que a generalização do medo também pudesse resultar dessa mesma interferência. Dessa forma, supõe-se que modulações nessas outras estruturas também tenham relevância para os efeitos induzidos pela hiperativação noradrenérgica, seja pelo fato delas também receberem projeções noradrenérgicas do *locus coeruleus* (RADLEY, WILLIAMS, SAWCHENKO, 2008; SARA, 2009; ZHANG, MULLER, MCDONALD, 2013) ou pela comunicação bidirecional com o hipocampo durante o processamento das memórias (HOOVER, VERTES, 2007; MAREN, PHAN, LIBERZON, 2013).

O envolvimento do HD na indução da generalização do medo foi confirmado pela sua estimulação com noradrenalina. A participação dessa estrutura na generalização do medo já foi apontada em outros estudos, sendo induzida, nesse caso, pela estimulação de receptores glicocorticoides (KAOUANE *et al.*, 2012). Embora a participação noradrenérgica no hipocampo para a modulação das memórias seja bastante clara (IZUMI, ZORUMSKI, 1999; HARLEY, 2007), os resultados apresentados apontam que a estimulação de receptores β -adrenérgicos hipocampais seria suficiente, ao menos nas condições adotadas, para induzir a generalização do medo, em acordo com dados prévios que indicaram o recrutamento central desses receptores. Como já discutido anteriormente, a participação desses receptores é bastante clara na consolidação das memórias de medo (IZQUIERDO *et al.*, 1992; JI, ZHANG, LI, 2003). O recrutamento desses receptores também é importante para a potencialização de uma memória de medo normal, já que a infusão de isoproterenol no HD também aumentou a expressão de comportamentos defensivos frente ao contexto pareado quando um protocolo de treino fraco foi utilizado, confirmando que a generalização do medo por estimulação direta dessa estrutura parece acontecer por potencialização na consolidação da memória gerada pelo treino forte, sustentando a teoria assintótica da generalização do medo.

Uma das teorias atuais para explicar a ocorrência da generalização do medo se baseia em princípios introduzidos pela hipótese da marcação sináptica (FREY, MORRIS, 1997). Segundo ela, os eventos que levam à formação de memórias promovem a ativação de diversas sinapses em diferentes intensidades, ao menos levando em conta o circuito hipocampal. As sinapses ativadas receberiam uma “marcação sináptica” molecular, responsável pela captura de proteínas

estruturais sintetizadas no neurônio, permitindo alterações plásticas seletivas em sinapses ativadas, processo que sustentaria as modificações necessárias para a representação daquela memória específica. No entanto, nem toda ativação neuronal causaria o mesmo efeito: estimulações de baixa intensidade, embora capazes de marcar a sinapse, não seriam suficientes para induzir a síntese proteica. Dessa forma, somente sinapses ativadas por estimulação alta (mais relevante) sofreriam modificações plásticas, garantindo a precisão e especificidade da memória em formação e impedindo, em condições normais, a ocorrência da generalização (REDONDO, MORRIS, 2011; VIOLA *et al.*, 2014). A transmissão noradrenérgica, especialmente via ativação de receptores β -adrenérgicos, teve o envolvimento implicado nessa teoria como um agente indutor da síntese de componentes proteicos relacionados à plasticidade (MONCADA *et al.*, 2011). O recrutamento adrenérgico forneceria os componentes moleculares necessários para a estabilização até mesmo de sinapses ativadas por estímulos menos importantes, “incluindo” no traço de memória representações de eventos periféricos ao principal, ou mesmo não relacionados (GERSHMAN, 2014). No presente estudo, a generalização do medo poderia acontecer por motivos semelhantes: em condições extremas de recrutamento adrenérgico, poderia haver a estabilização de uma rede neural que englobaria diversas características irrelevantes associadas à ocorrência do evento traumático, o que dificultaria a discriminação de pistas que remeteriam especificamente ao evento em si (MORRIS, 2006). Além disso, esse processo poderia facilitar, ou mesmo subsidiar, a superconsolidação que sustentaria a ocorrência das demais características anormais das memórias traumáticas (DUDAI, 2002). Embora o papel dos receptores β -adrenérgicos induzindo a síntese proteica seja descrito no contexto dessa teoria, a determinação de subtipos específicos desses receptores ainda não foi determinada.

A generalização do medo induzida pela hiperativação noradrenérgica foi prevenida pelo antagonismo de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos localizados no HD. A expressão de todos os subtipos de receptores β -adrenérgicos é evidente no hipocampo (SUMMERS *et al.*, 1995; NICHOLAS, HÖKFELT, PIERIBONE, 1996; HILLMAN *et al.*, 2005), embora existam diferenças quanto à expressão ($\beta_1 < \beta_2 < \beta_3$) que poderiam justificar variações quanto à ação da noradrenalina (GIBBS, SUMMERS, 2000). Adicionalmente, os subtipos de receptores β -adrenérgicos apresentam uma divergência quanto à expressão em interneurônios (COX, RACCA, LEBEAU, 2008; LIU *et al.*, 2014) e até na membrana nuclear de neurônios hipocámpais (GUO, LI, 2007),

podendo sugerir mecanismos de transdução de sinal após a internalização desses receptores. Dessa maneira, são adicionadas mais variáveis no recrutamento diferencial desses receptores e na diversificação na sinalização mediada por eles. Nesse contexto, poucos são os estudos que contribuem para a elucidação do papel de subtipos específicos de receptores β -adrenérgicos na formação da memória, já que a maioria deles, até hoje, faz uso de ferramentas farmacológicas desprovidas da seletividade requerida para tal. Quando antagonistas ou agonistas mais seletivos são utilizados, raramente suas atividades se estendem além dos receptores β_1 . Embora esses últimos tenham função melhor estabelecida no processamento das memórias (MCGAUGH, 2000; QU, GUO, LI, 2008; MARZO, BAI, OTANI, 2009; DO-MONTE *et al.*, 2010), a generalização do medo induzida pela hiperativação noradrenérgica parece não recrutar esses receptores no HD, o que pode parecer controverso à primeira vista. Contudo, estudos mais recentes indicam que o efeito excitatório induzido pela ativação desses receptores, demonstrado pelo aumento da excitabilidade neuronal induzida em fatias de hipocampo (JURGENS *et al.*, 2005), teria um papel crucial na evocação das memórias, ao menos nessa estrutura (FAIZI *et al.*, 2011; MURCHISON *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013). No nosso caso, mesmo que a dose de atenolol utilizada tenha sido maior que a dos demais antagonistas (40 vs. 10 nmol), sua seletividade provavelmente foi mantida, já que nenhuma alteração foi observada, um resultado esperado caso o antagonista passasse a bloquear, também, receptores β_2 e/ou β_3 . De qualquer forma, não se pode descartar definitivamente a possível participação dos receptores β_1 , já que apenas uma dose do antagonista foi utilizada. O uso de agentes com maior seletividade para receptores β_1 poderia fornecer evidências mais definitivas quanto à participação deles no protocolo adotado.

Alguns estudos indicam o potencial facilitatório da ativação de receptores β_2 sobre a formação das memórias aversivas e processos plásticos relacionados (HILLMAN, DOZE, PORTER, 2005; JOINER *et al.*, 2010; QIAN *et al.*, 2012; DANG *et al.*, 2014; LAING, BASHIR, 2014), inclusive frente à sua ativação em estruturas encefálicas como o hipocampo dorsal (HAVEKES *et al.*, 2012), amígdala (MCINTYRE *et al.*, 2005; QU, GUO, LI, 2008; OUYANG *et al.*, 2012) e córtex pré-frontal (ZHOU *et al.*, 2013). Mesmo as memórias emocionais de caráter reforçador, como àquelas relacionadas ao abuso de drogas, são facilitadas pela ativação desses receptores (BERNARDI *et al.*, 2009; LALUMIERE, NIEHOFF, KALIVAS, 2010), que podem, inclusive, recuperar o prejuízo de memória observado em animais idosos

(RAMOS *et al.*, 2008) ou em modelos de doenças neurodegenerativas (WANG, ROWAN, ANWYL, 2009; LI *et al.*, 2013c; BRANCA *et al.*, 2014). Já a participação de receptores β_3 -adrenérgicos no processamento cognitivo é bem menos explorada: os poucos estudos que implicam o envolvimento deles no processamento das memórias indicam o seu papel facilitatório na consolidação de memórias espaciais em aves (GIBBS, SUMMERS, 2000; GIBBS *et al.*, 2010). Em roedores, alguns estudos demonstram efeitos centrais de agonistas seletivos β_3 , como efeitos antidepressivos/ansiolíticos (CLAUSTRE *et al.*, 2008; TAMBURELLA *et al.*, 2010), redução na motivação para o consumo de etanol (BUTLER, CHAPPELL, WEINER, 2014) e ativação de precursores neurogênicos hipocampais (JHAVERI *et al.*, 2010), sem evidências diretas sobre a sua participação na memória.

Reforçando os resultados anteriores, a estimulação do HD com agonistas seletivos de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos foi suficiente para induzir a generalização do medo. De maneira interessante, esses dois receptores apresentam uma afinidade reduzida à noradrenalina quando comparados ao subtipo β_1 , havendo a necessidade de uma descarga noradrenérgica significativa para permitir a sua ativação (ZHANG, OUYANG, THOMAS, 2004). Transpondo essa informação para o contexto clínico, pode-se supor que haveria um recrutamento mais evidente desses subtipos em condições onde uma hiperativação noradrenérgica fosse maior, como o descrito durante a consolidação de memórias traumáticas em pessoas que desenvolveram PTSD (PITMAN, 1989; YEHUDA, MCFARLANE, SHALEV, 1998). Além disso, diferenças quanto ao mecanismo de transdução de sinal poderiam justificar o recrutamento de alguns subtipos de receptores β . Embora seja aceito que a ativação de receptores β -adrenérgicos, de uma maneira geral, leve à ativação da proteína G_s , essa regra pode não ser aplicável em todos os casos, já que os receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos podem se acoplar à proteína G_i (HUTCHINSON *et al.*, 2002; SCHUTSKY, OUYANG, THOMAS, 2011; OUYANG *et al.*, 2012). Outros estudos sugerem que mecanismos mais gerais poderiam ser responsáveis pela ação dos subtipos β_2 e β_3 na potencialização das memórias, como a indução da glicogenólise no cérebro ou da facilitação no transporte de glicose nos neurônios (GIBBS, HUTCHINSON, SUMMERS, 2008) e mesmo no transporte de oxigênio no sistema nervoso central (HARE *et al.*, 2006). Além disso, já foi demonstrado que a ativação de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos localizados na periferia podem ter seus efeitos mediados pelo óxido nítrico (CALVERT, LEFER, 2013; CONTI *et al.*,

2013; BELGE et al., 2014), outra via pouco ortodoxa de transdução de sinal frente à ativação noradrenérgica.

4.5.2 A ativação noradrenérgica recruta a via nitrérgica no hipocampo dorsal

A inibição da nNOS e GCs no HD preveniu a generalização do medo induzida pela ioimbina. Esses resultados são os primeiros implicando a participação da transmissão nitrérgica hipocampal na indução da generalização do medo, já que a maioria dos estudos se restringe em avaliar a participação do NO em memórias aversivas normais (IZQUIERDO *et al.*, 1992; JI, ZHANG, LI, 2003). Vale ressaltar que o aumento na síntese de NO na porção ventral do hipocampo causa alterações cardiovasculares (SANTINI *et al.*, 2013), outra característica observada em pacientes com PTSD e que acompanha a memória de medo disfuncional. Dessa forma, talvez outras características do PTSD modeladas pela hiperativação noradrenérgica também dependam do recrutamento nitrérgico.

Confirmando que o recrutamento nitrérgico se deu pela ativação noradrenérgica no HD, a inibição da nNOS também preveniu a generalização do medo induzida pela estimulação direta dessa estrutura com noradrenalina ou o agonista seletivo de receptores β -adrenérgicos, isoproterenol. Esse resultado sugere que o recrutamento da via nitrérgica acontece em sequência à ativação noradrenérgica (*i.e.*, ‘*downstream*’), que utiliza esse neurotransmissor atípico como efetor na potencialização da memória. Embora estudos demonstrem a interação noradrenérgica-nitrérgica no controle do eixo HPA (GADEK-MICHALSKA, BUGAJSKI, 2008), não se sabe ao certo se essa interação seria em nível celular (*i.e.*, interação durante a transdução de sinal mediado pela ativação de receptores β) ou entre circuitos neurais, já que as interferências farmacológicas foram realizadas pela via intracerebroventricular. Os nossos resultados indicam a possibilidade de interação em nível celular, já que ambas as interferências foram realizadas diretamente no hipocampo. Classicamente, o NO é um mediador importante no desenvolvimento de respostas defensivas rápidas, especialmente naquelas de medo e fuga (GUIMARÃES *et al.*, 2005), sendo que a sua função em substratos neurais relacionados à elaboração de repertórios defensivos tem sido bastante explorada (DE OLIVEIRA, DEL BEL, GUIMARÃES, 2001). Com base nisso, pode-se pensar que o envolvimento nitrérgico seria especialmente relevante no caso das memórias de valência negativa. Contudo, o recrutamento da via

nitrérgica após a ativação de receptores β -adrenérgicos localizados no hipocampo já foi descrito para memórias de reconhecimento de objeto (FURINI *et al.*, 2010), sugerindo que essa via de transdução também pode ser relevante para a formação de memórias desprovidas do caráter aversivo. No entanto, o estudo não determinou qual o subtipo de receptor β -adrenérgico é responsável por esse resultado nesse estudo. Além dos receptores β -adrenérgicos, alguns subtipos de receptores α_1 -adrenérgico também podem recrutar a via do NO por meio da interação com a nNOS (PUPO, MINNEMAN, 2002). Essa possibilidade não foi avaliada no protocolo adotado, uma vez que resultados prévios demonstraram que os receptores α_1 parecem não ser relevante no desenvolvimento da generalização do medo.

Embora tanto os receptores β_2 - quanto β_3 -adrenérgicos possam se acoplar à via do óxido nítrico (HARTUNG, CISZEK, NACKLEY, 2014), o recrutamento da via nitrérgica no HD nas condições adotadas é uma particularidade da ativação do subtipo β_3 , já que a inibição da nNOS só preveniu o efeito induzido pela sua ativação. Embora o recrutamento nitrérgico por meio da ativação de receptores β_3 seja descrito na literatura, com importância na fisiologia cardiovascular (KOU, MICHEL, 2007; ANGELONE *et al.*, 2008; BALLIGAND, 2013; ZHANG *et al.*, 2014), ainda não se sabe ao certo o mecanismo de transdução de sinal que levaria à ativação da nNOS. Recentemente, foi determinada que a ativação de receptores β_3 -adrenérgicos expressos membrana nuclear de cardiomiócitos aumenta a produção de NO pela forma endotelial da NOS (VANIOTIS *et al.*, 2013). Um dos mecanismos propostos para a ativação dessa enzima é a modulação dos níveis intracelulares de AMPc e consequente alteração nas concentrações de cálcio, que regula a sua atividade (FULTON, GRATTON, SESSA, 2001; GOVERS, RABELINK, 2001). Periféricamente, a ativação de receptores β_3 -adrenérgicos causa o recrutamento da via da Rac1/PKA/Akt por meio da ativação de G_s , fosforilando algumas formas da NOS e aumentando a sua atividade (FIGUEROA *et al.*, 2009; CALVERT, LEFER, 2013). Como a maioria desses trabalhos foca no estudo de efeitos periféricos da NOS, não se pode transpor imediatamente esses achados para o sistema nervoso central. No entanto, já que alguns efeitos mediados pela ativação de receptores β_3 -adrenérgicos periféricos parecem ser dependentes de nNOS (ARAGÓN *et al.*, 2011), pode-se supor que mecanismos semelhantes direcionariam o recrutamento da via nitrérgica no sistema nervoso central.

Embora a ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos também seja importante na indução da generalização do medo, o bloqueio da nNOS não preveniu esse efeito, implicando a ocorrência de outro mecanismo por trás da sua ação. Mesmo que a ativação da nNOS seja um dos mecanismos envolvidos com as respostas da ativação β_2 -adrenérgica na veia mesentérica (MARTÍNEZ-CUESTA *et al.*, 1996), sabe-se que esses receptores podem se acoplar a proteínas G_i e G_s , recrutando vias diversas – além da nitrérgica – que poderiam ser envolvidas no processamento da memória. De maneira interessante, o recrutamento de receptores β_2 -adrenérgicos e ativação da proteína G_s também aumentam a atividade da NOS por facilitar a sua fosforilação induzida pela Akt, mas de maneira Rac1/PKA independente, em contraste à resultante da ativação β_3 (CALVERT, LEFER, 2013). Uma vez que já foi demonstrada a expressão e funcionalidade de receptores β_2 -adrenérgicos acoplados à proteína G_i no hipocampo (OUYANG *et al.*, 2012), isso poderia justificar a ausência do recrutamento nitrérgico induzida por esses receptores no hipocampo, que supostamente dependeria da ativação via proteína G_s para o recrutamento da via da Akt. No entanto, não se pode descartar o recrutamento de vias do NO pelos receptores β_2 , já que a sua ativação poderia aumentar a atividade de outras isoformas da NOS, como a endotelial, que é expressa constitutivamente no HD (LIU *et al.*, 2003), com atividade importante para a LTP (O'DELL *et al.*, 1994); ou mesmo a forma induzida, cuja expressão é aumentada no hipocampo de ratos estressados (HARVEY *et al.*, 2004) e também é envolvida no processamento das memórias (UDAYABANU *et al.*, 2008). Dessa forma, experimentos adicionais são necessários para determinar as vias de transdução envolvidas com a ativação β_2 , seja com o uso de inibidores de outras isoformas da NOS ou inibidores de outras vias específicas de transdução de sinal. O envolvimento de vias de transdução “adicionais” pela subunidade $\beta\gamma$ da proteína G ativada aumenta as possibilidades de diversificação no sinal (LIN, SMRCKA, 2011; KHAN *et al.*, 2013), além da existência de mecanismos de transdução independentes de proteínas G (TZINGOUNIS, ZASTROW, YUDOWSKI, 2010), que poderiam estar por trás da generalização do medo induzida pela ativação de receptores β_2 -adrenérgicos.

Corroborando os resultados anteriores, a ativação direta da via do NO no HD foi suficiente para induzir a generalização do medo, confirmando o seu recrutamento *downstream* à ativação noradrenérgica e implicando a participação da rota NO/GMPc hipocampal na formação da memória disfuncional. Outros estudos já demonstraram o envolvimento dessa via no hipocampo (SHEN *et al.*, 2012a) e no núcleo

accumbens (SHEN *et al.*, 2014) para a formação de memórias associadas ao abuso de drogas. A via NO/GMPc/PKG aumenta o BDNF no hipocampo (FURINI *et al.*, 2010), cuja função é clara nos processos plásticos relacionados à consolidação da memória (TYLER *et al.*, 2002). No entanto, as ações do NO não se limitam a essa via, havendo também a fosforilação e aumento da atividade da ERK e CAMKII no hipocampo (MOOSAVI *et al.*, 2014), e facilitação da LTP de maneira independente das quinases moduladas pelo GMPc, aumentando o número de alvos possíveis para a modulação das memórias de medo nesse caso. Por conta desses efeitos facilitatórios sobre as memórias, o potencial terapêutico de fármacos com ação nitrérgica é sempre considerado (BARATTI, BOCCIA, 1999; BOCCIA *et al.*, 2011). Por essa razão, drogas nitrérgicas relativamente seguras – como inibidores de diferentes isoformas da fosfodiesterase – são investigadas como agentes nootrópicos em potencial (SANDERSON, SHER, 2013), especialmente para os casos onde a perda de memória é patológica e relacionada à progressão de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (PUZZO *et al.*, 2008; ZHIHUI, 2013) e Huntington (SAAVEDRA *et al.*, 2013). Contudo, o uso desses compostos merece maiores estudos, já que, com base nos resultados apresentados, a associação dos seus efeitos com a ocorrência de eventos aversivos poderia levar ao desenvolvimento de memórias negativas de valência considerável.

4.6 CONCLUSÕES

O recrutamento do hipocampo dorsal, evidenciado pelo aumento na expressão de Arc, é envolvido na superconsolidação da memória de medo causada pela hiperativação noradrenérgica. Frente à ativação de receptores β -adrenérgicos localizados no hipocampo dorsal, especialmente os subtipos β_2 - e β_3 -, a memória de medo foi consolidada de maneira exagerada, permitindo a generalização do medo. Esses resultados estendem o conhecimento sobre as bases neurobiológicas dessa característica inapropriada, reforçando o papel do hipocampo nesse processo. Adicionalmente, as diferenças quanto às características farmacológicas dos subtipos de receptores β -adrenérgicos, juntamente com a expressão heterogênea no cérebro, podem sugerir diferenças funcionais quanto à sua participação em diferentes etapas e processos relacionados à formação das memórias, além do descrito nesse trabalho. A interação entre as vias noradrenérgica e nitrérgica durante a formação de memórias de medo pôde ser dissecada funcionalmente a nível hipocampal, fornecendo evidências do envolvimento específico do

receptor β_3 -adrenérgico e da nNOS na indução da generalização do medo. O envolvimento nitrérgico no hipocampo dorsal foi confirmado, uma vez que o seu recrutamento, por si só, foi suficiente para induzir o perfil de generalização do medo.

5

Considerações finais e perspectivas

“Todos precisam de memórias; Elas mantêm o lobo da insignificância longe da porta da frente.”

— **Saul Bellow**

O conjunto de resultados apresentado representa uma atualização do conhecimento relacionado à farmacologia da modulação noradrenérgica das memórias aversivas, desde aquelas de caráter normal até às disfuncionais, com características inapropriadas comuns às memórias traumáticas, incluindo: **(I)** o fato das diferenças funcionais entre a consolidação e a reconsolidação de memórias adaptativas se estender ao recrutamento de receptores adrenérgicos; **(II)** a generalização do medo ser consequência da potencialização da memória para uma magnitude que suplanta o limite de expressão de comportamentos defensivos frente ao contexto pareado, *i.e.*, após a expressão de congelamento frente ao contexto pareado alcançar níveis assintóticos; **(III)** diversas características inapropriadas associadas às memórias de medo – e relacionadas ao PTSD – poderem ser modeladas por meio da hiperativação noradrenérgica durante a consolidação e; **(IV)** a generalização do medo induzida pela hiperativação noradrenérgica envolver a ativação de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos no hipocampo dorsal, com recrutamento específico da transmissão nitrérgica pelo subtipo β_3 . De maneira geral, esses achados encontram-se resumidos na **Fig. 43**.

Embora as diferenças entre os processos de consolidação e reconsolidação sejam exaustivamente investigados, os nossos resultados foram os primeiros a evidenciar uma diferença quanto ao recrutamento de receptores adrenérgicos. Levando em conta aspectos fisiológicos e farmacológicos, esses resultados demonstram empiricamente a função de um sistema de transmissão composto por diferentes receptores que respondem a um mesmo neurotransmissor, permitindo a diversificação da transdução do sinal pelo recrutamento de diferentes tipos de proteínas G e de cascatas intracelulares subsequentes, além de diferenças quanto à afinidade pela noradrenalina e expressão heterogênea no sistema nervoso central. Dessa forma, a noradrenalina consegue induzir um espectro amplo de respostas de acordo com o receptor recrutado e/ou circuitos neurais preferencialmente envolvidos com cada uma das etapas de estabilização da memória. Embora a diferença no envolvimento de receptores α_1 - e β -adrenérgicos possivelmente aconteça pelo recrutamento de um conjunto divergente de estruturas encefálicas durante a consolidação e a reconsolidação, experimentos subsequentes são necessários para comprovar essa possibilidade. Adicionalmente, o aprofundamento do conhecimento acerca dos subtipos de receptores recrutados em cada um desses casos também poderia ser realizado com o uso de ferramentas farmacológicas mais seletivas. Nesse sentido, a escassez de agentes com seletividade adequada para os diferentes

subtipos de receptores α_1 são um obstáculo. Mesmo que antagonistas seletivos de subtipos de receptores β -adrenérgicos tenham sido utilizados para elucidar aspectos relacionados em experimentos finais desse trabalho, o aprofundamento dos mecanismos farmacológicos relacionados ao processamento de memórias aversivas normais foi deixado como segundo plano frente à opção de direcionar os experimentos seguintes para a formação de memórias disfuncionais.

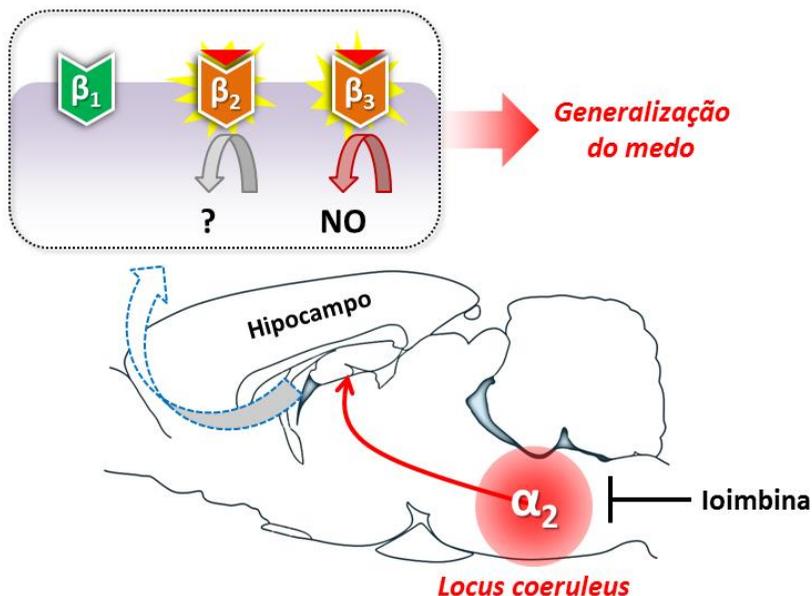


Figura 43. A hiperativação noradrenérgica induz a generalização do medo pelo recrutamento de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos presentes no hipocampo dorsal. O antagonismo de receptores α_2 -adrenérgicos, expressos de maneira significativa no *locus coeruleus*, causaria um aumento na liberação de noradrenalina no cérebro, ativando receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos presentes no hipocampo dorsal. O recrutamento da via nitrérgica acontece como consequência da ativação β_3 , embora o mecanismo envolvido na indução da generalização do medo pela ativação β_2 não tenha sido determinada.

Levando em conta o número restrito de estudos visando compreender melhor a generalização do medo, os experimentos seguintes focaram na elucidação de mecanismos de indução dessa característica inapropriada. A demonstração de que a generalização do medo resulta da potencialização da memória de medo a níveis que

ultrapassariam a sensibilidade do teste utilizado (*i.e.*, que alcançariam um nível máximo de respostas defensivas frente ao contexto pareado) fornece uma base para a caracterização dessa resposta como consequência da formação de memórias de medo exageradas. Adicionalmente, a possibilidade de induzir respostas de generalização do medo após a hiperativação noradrenérgica durante qualquer etapa da estabilização da memória, desde que níveis elevados da resposta defensiva sejam atingidos frente ao contexto pareado com os choques, indica a possibilidade de surgimento de respostas disfuncionais ao longo do processo dinâmico de formação e manutenção das memórias, informação que pode ter um valor translacional quando se leva em consideração o período de “incubação” geralmente observado para o diagnóstico do PTSD. De maneira interessante, o recrutamento único de receptores β -adrenérgicos centrais para a generalização do medo indica que esse parece ser um evento que não acontece necessariamente por um simples “reflexo” dos mecanismos necessários para a consolidação ou reconsolidação da memória, já que é independente do recrutamento diferencial de receptores adrenérgicos evidente nessas etapas.

Como a generalização do medo é uma das características observadas em pacientes com PTSD, fomos levados a investigar se outras características correlatas também resultariam da hiperativação noradrenérgica. Nesse aspecto, a caracterização das respostas disfuncionais resultantes do protocolo experimental adotado – como a generalização do medo persistente, o aumento da pressão arterial, a sensibilização ao medo, a resistência à extinção, a agentes amnésicos e antiaversivos – permite a sua utilização como uma alternativa no estudo de memórias de medo que sejam mais próximas àquelas que originam o PTSD. A possibilidade de prejudicar a reconsolidação da memória aversiva e reverter a generalização do medo fazendo uso de agentes adjuvantes que facilitem a labilização da memória é um resultado promissor, que estimula o uso desse protocolo comportamental na triagem de agentes que possam ter eficácia mesmo nas memórias disfuncionais de pacientes com PTSD. Mesmo que essa etapa do trabalho não tenha sido o objetivo inicial proposto no projeto de doutorado, a caracterização preliminar desse modelo animal para o estudo de memórias disfuncionais pode ter um impacto translacional no estudo das memórias aversivas. Obviamente, outras características disfuncionais relacionadas ao PTSD permanecem a ser investigadas no nosso protocolo, como a ocorrência de anedonia, aumento no consumo de drogas de abuso ou mesmo a susceptibilidade ao tratamento com antidepressivos. Embora o perfil de anedonia tenha sido avaliado poucos

dias após a indução da generalização do medo, os resultados foram sido omitidos, já que nenhuma diferença foi observada. Estudos posteriores devem ser conduzidos na intenção de verificar a ocorrência da anedonia algumas semanas depois, já que essa característica poderia ter um desenvolvimento mais lento. Adicionalmente, como a memória disfuncional foi induzida pela hiperativação noradrenérgica, não se pode deixar de levar em conta que a anedonia pode não ter sido evidente por não apresentar um grau de relação muito alto com essa via de transmissão.

Fazendo um aprofundamento farmacológico dos mecanismos que levam à generalização do medo, conseguimos demonstrar a participação do hipocampo dorsal como uma estrutura chave no desenvolvimento dessa resposta, especialmente pelo recrutamento de receptores β_2 - e β_3 -adrenérgicos e subsequente envolvimento da via nitrérgica. No cenário do estudo das memórias, muitas vezes os agentes farmacológicos são utilizados como ferramentas experimentais, sem a intenção de esclarecer os mecanismos farmacológicos envolvidos, o que faz com que a maioria dos estudos seja restrita ao contexto da neurociência, com pouco impacto na farmacologia. Obviamente, isso não é um problema ou defeito, e muito menos compromete a importância desses trabalhos. No entanto, a nossa proposta foi justamente rebuscar uma investigação que levasse em conta a farmacologia de uma maneira mais profunda, aproximando os resultados ao contexto da neuropsicofarmacologia. Por conta disso, a utilização de agonistas e antagonistas seletivos para subtipos de receptores β -adrenérgicos teve como maior objetivo estender o entendimento dos seus papéis no processamento das memórias. Pode-se destacar o envolvimento do subtipo β_3 nesse caso, já que até pouco tempo eles eram considerados apenas como mediadores da lipólise na periferia, como ainda consta na maioria dos livros atuais de farmacologia. A caracterização desses receptores no processamento cognitivo abre caminho para estudos futuros e o uso desse receptor como alvo terapêutico em transtornos relacionados com disfunções do sistema nervoso central. De fato, as possíveis implicações clínicas da modulação desse receptor já são especuladas (URSINO *et al.*, 2009). Quando se leva em conta a baixa afinidade dos receptores β_3 -adrenérgicos pela noradrenalina, tornando a ativação desse receptor um evento muito mais relacionado às situações em que ocorra a liberação maciça desse transmissor, aumenta ainda mais a sua relevância translacional em potencial. Como as suas funções são pouco estabelecidas, esses resultados encorajam mais experimentos buscando elucidar seu envolvimento no processamento das memórias e,

translacionalmente, no desenvolvimento do PTSD. A participação da via nitrérgica no PTSD vem recebendo maior atenção (PALL, 2001; OOSTHUIZEN, WEGENER, HARVEY, 2005), sendo que um aumento na expressão da nNOS foi observado no hipocampo em modelos animais para o PTSD em roedores (HOU, LIU, XIONG, 2013). Nesse sentido, alguns estudos em humanos sugerem que a maquinaria envolvida com a transmissão nitrérgica poderia estar alterada em pacientes com PTSD (LAWFORD *et al.*, 2013), implicando essa via na indução/manutenção e severidade desse transtorno psiquiátrico. Nesse contexto, o envolvimento nitrérgico merece destaque não só pela importância na indução da generalização do medo, mas também pela sua caracterização como uma via recrutada após a ativação β_3 -adrenérgica, embora o mecanismo que leve à ativação da nNOS ainda não tenha sido determinado. Com isso, os receptores β_3 -adrenérgicos e a nNOS parecem constituir alvos potenciais para o tratamento de memórias traumáticas, merecendo destaque em estudos posteriores. Contudo, ainda resta aprofundar aspectos neurobiológicos e farmacológicos relacionados à indução das demais características disfuncionais da memória gerada frente à hiperativação noradrenérgica em estudos posteriores.

6

REFERÊNCIAS

- ABE K. 2001. Modulation of hippocampal long-term potentiation by the amygdala: a synaptic mechanism linking emotion and memory. *Jpn J Pharmacol* 86(1):18-22.
- ABERCROMBIE ED, KELLER RW JR, ZIGMOND MJ. 1988. Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies. *Neuroscience* 27:897-904.
- ABRAHAM WC, WILLIAMS JM. 2008. LTP maintenance and its protein synthesis-dependence. *Neurobiol Learn Mem* 89(3):260-268.
- ACHTERBERG EJ, TREZZA V, VANDERSCHUREN LJ. 2012. β -Adrenoreceptor stimulation mediates reconsolidation of social reward-related memories. *PLoS One* 7(6):e39639.
- ADAMEC R, HEBERT M, BLUNDELL J. 2011. Long lasting effects of predator stress on pCREB expression in brain regions involved in fearful and anxious behavior. *Behav Brain Res* 221(1):118-133.
- ADAMEC R, MUIR C, GRIMES M, PEARCEY K. 2007. Involvement of noradrenergic and corticoid receptors in the consolidation of the lasting anxiogenic effects of predator stress. *Behav Brain Res* 179:192-207.
- ADAMEC R, STRASSER K, BLUNDELL J, BURTON P, MCKAY DW. 2006. Protein synthesis and the mechanisms of lasting change in anxiety induced by severe stress. *Behav Brain Res* 167(2):270-286.
- AGUADO L. 2003. Neuroscience of Pavlovian conditioning: a brief review. *Span J Psychol* 6(2):155-167.
- AHLQUIST RP. 1948. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 153(3):586-600.
- AHLQUIST RP. 1980. Historical perspective. Classification of adrenoreceptors. *J Auton Pharmacol* 1(1):101-106.
- AKIRAV I, SEGEV A, MOTANIS H, MAROUN M. 2009. D-cycloserine into the BLA reverses the impairing effects of exposure to stress on the extinction of contextual fear, but not conditioned taste aversion. *Learn Mem* 16(11):682-686.
- ALBERINI CM, LEDOUX JE. 2013. Memory reconsolidation. *Curr Biol* 23(17):R746-750.
- ALBERINI CM. 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28(1):51-56.

- ALBERINI CM. 2011. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Front Behav Neurosci* 5:12.
- ALEXANDER RW, DAVIS JN, LEFKOWITZ RJ. 1975. Direct identification and characterisation of beta-adrenergic receptors in rat brain. *Nature* 258(5534):437-440.
- ANGELONE T, FILICE E, QUINTIERI AM, IMBROGNO S, RECCHIA A, PULERÀ E, MANNARINO C, PELLEGRINO D, CERRA MC. 2008. Beta3-adrenoceptors modulate left ventricular relaxation in the rat heart via the NO-cGMP-PKG pathway. *Acta Physiol* 193(3):229-239.
- ANISMAN H. 2011. Sensitization in relation to posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 70:404-405.
- ARAGÓN JP, CONDIT ME, BHUSHAN S, PREDMORE BL, PATEL SS, GRINSFELDER DB, GUNDEWAR S, JHA S, CALVERT JW, BAROUCH LA, LAVU M, WRIGHT HM, LEFER DJ. 2011. Beta3-adrenoceptor stimulation ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase and neuronal nitric oxide synthase activation. *J Am Coll Cardiol* 58(25):2683-2691.
- ARCH JR, AINSWORTH AT, CAWTHORNE MA, PIERCY V, SENNITT MV, THODY VE, WILSON C, WILSON S. 1984. Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature* 309(5964):163-165.
- BALLIGAND JL. 2013. Beta3-adrenoreceptors in cardiovascular diseases: new roles for an "old" receptor. *Curr Drug Deliv* 10(1):64-66.
- BARATTI CM, BOCCIA MM. 1999. Effects of sildenafil on long-term retention of an inhibitory avoidance response in mice. *Behav Pharmacol* 10(8):731-737.
- BELGE C, HAMMOND J, DUBOIS-DERUY E, MANOURY B, HAMELET J, BEAULOYE C, MARKL A, POULEUR AC, BERTRAND L, *et al.* 2014. Enhanced expression of β 3-adrenoceptors in cardiac myocytes attenuates neurohormone-induced hypertrophic remodeling through nitric oxide synthase. *Circulation* 129(4):451-462.
- BERNABEU R, SCHMITZ P, FAILLACE MP, IZQUIERDO I, MEDINA JH. 1996. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport* 7(2):585-588.
- BERNARDI RE, LATTAL KM, BERGER SP. 2006. Postretrieval propranolol disrupts a cocaine conditioned place preference. *Neuroreport* 17(13):1443-1447.
- BERNARDI RE, LATTAL KM. 2010. A role for alpha-adrenergic receptors in extinction of conditioned fear and cocaine conditioned place preference. *Behav Neurosci* 124(2):204-210.
- BERNARDI RE, RYABININ AE, BERGER SP, LATTAL KM. 2009. Post-retrieval disruption of a cocaine conditioned place preference by systemic and intrabasolateral amygdala beta2- and alpha1-adrenergic antagonists. *Learn Mem* 16:777-789.

- BESNARD A, CABOCHE J, LAROCHE S. 2012. Reconsolidation of memory: a decade of debate. *Prog Neurobiol* 99:61-80.
- BESNARD A, LAROCHE S, CABOCHE J. 2014. Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval. *Brain Struct Funct* 219(1):415-430.
- BHUVANESWAR CG, RUSKIN JN, KATZMAN AR, WOOD N, PITMAN RK. 2014. Pilot study of the effect of lipophilic vs. hydrophilic beta-adrenergic blockers being taken at time of intracardiac defibrillator discharge on subsequent PTSD symptoms. *Neurobiol Learn Mem* 112:248-252.
- BLANCHARD RJ, YANG M, LI CI, GERVACIO A, BLANCHARD DC. 2001. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8):587-595.
- BLISS TV, COLLINGRIDGE GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407):31-39.
- BLISS TV, LØMO T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232(2):331-356.
- BOCCIA MM, BLAKE MG, KRAWCZYK MC, BARATTI CM. 2011. Sildenafil, a selective phosphodiesterase type 5 inhibitor, enhances memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice. *Behav Brain Res* 220(2):319-324.
- BOUTON ME, MOODY EW. 2004. Memory processes in classical conditioning. *Neurosci Biobehav Rev* 28(7):663-674.
- BOUTON ME. 2014. Why behavior change is difficult to sustain. *Prev Med* 68:29-36.
- BRACHA HS. 2006. Human brain evolution and the "Neuroevolutionary Time-depth Principle:" Implications for the Reclassification of fear-circuitry-related traits in DSM-V and for studying resilience to warzone-related posttraumatic stress disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30(5):827-853.
- BRADY K, PEARLSTEIN T, ASNIS GM, BAKER D, ROTHBAUM B, SIKES CR, FARFEL GM. 2000. Efficacy and safety of sertraline treatment of posttraumatic stress disorder: a randomized controlled trial. *JAMA* 283(14):1837-1844.
- BRAMHAM CR, ALME MN, BITTINS M, KUIPERS SD, NAIR RR, PAI B, PANJA D, SCHUBERT M, SOULE J, TIRON A, WIBRAND K. 2010. The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res* 200(2):125-140.
- BRAMHAM CR, BACHER-SVENDSEN K, SARVEY JM. 1997. LTP in the lateral perforant path is beta-adrenergic receptor-dependent. *Neuroreport* 8(3):719-724.
- BRAMHAM CR, WORLEY PF, MOORE MJ, GUZOWSKI JF. 2008. The immediate early gene arc/arg3.1: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* 28(46):11760-11767.
- BRANCA C, WISELY EV, HARTMAN LK, CACCAMO A, ODDO S. 2014. Administration of a selective β_2 adrenergic receptor antagonist exacerbates

- neuropathology and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 35(12):2726-2735.
- BRAUN P, GREENBERG D, DASBERG H, LERER B. 1990. Core symptoms of posttraumatic stress disorder unimproved by alprazolam treatment. *J Clin Psychiatry* 51(6):236-238.
- BRISCIONE MA, JOVANOVIC T, NORRHOLM SD. 2014. Conditioned fear associated phenotypes as robust, translational indices of trauma-, stressor-, and anxiety-related behaviors. *Front Psychiatry* 5:88.
- BRUIJNZEEL AW, STAM R, CROISET G, WIEGANT VM. 2001. Long-term sensitization of cardiovascular stress responses after a single stressful experience. *Physiol Behav* 73(1-2):81-86.
- BRUNET A, THOMAS É, SAUMIER D, ASHBAUGH AR, AZZOUG A, PITMAN RK, ORR SP, TREMBLAY J. 2014. Trauma reactivation plus propranolol is associated with durably low physiological responding during subsequent script-driven traumatic imagery. *Can J Psychiatry* 59(4):228-232.
- BUCHERELLI C, BALDI E, MARIOTTINI C, PASSANI MB, BLANDINA P. 2006. Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. *Learn Mem* 13(4):426-430.
- BUSTOS SG, GIACHERO M, MALDONADO H, MOLINA VA. 2010. Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-reactivation D-cycloserine administration. *Neuropsychopharmacology* 35:1097-1108.
- BUSTOS SG, MALDONADO H, MOLINA VA. 2006. Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. *Neuroscience* 139(3):831-842.
- BUSTOS SG, MALDONADO H, MOLINA VA. 2009. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology* 34(2):446-457.
- BUTLER TR, CHAPPELL AM, WEINER JL. 2014. Effect of β_3 adrenoceptor activation in the basolateral amygdala on ethanol seeking behaviors. *Psychopharmacology* 231(1):293-303.
- BYLUND DB. 1985. Heterogeneity of alpha-2 adrenergic receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 22(5):835-843.
- BYLUND DB. 2007. Receptors for norepinephrine and signal transduction pathways. In: ORDWAY GA, SCHWARTZ MA, FRAZER A (Eds.). *Brain Norepinephrine: Neurobiology and Therapeutics*. New York: Cambridge University Press, p.105-130.
- CAHILL L, ALKIRE MT. 2003. Epinephrine enhancement of human memory consolidation: interaction with arousal at encoding. *Neurobiol Learn Mem* 79(2):194-198.
- CAHILL L, MCGAUGH JL. 1996. Modulation of memory storage. *Curr Opin Neurobiol* 6(2):237-242.
- CAHILL L, PRINS B, WEBER M, MCGAUGH JL. 1994. Beta-adrenergic activation and memory for emotional events. *Nature* 371:702-704.
- CAIN CK, BLOUIN AM, BARAD M. 2004. Adrenergic transmission facilitates extinction of conditional fear in mice. *Learn Mem* 11:179-187.

- CAIN CK, MAYNARD GD, KEHNE JH. 2012. Targeting memory processes with drugs to prevent or cure PTSD. *Expert Opin Investig Drugs* 21:1323-1350.
- CALVERT JW, LEFER DJ. 2013. Role of β -adrenergic receptors and nitric oxide signaling in exercise-mediated cardioprotection. *Physiology* 28(4):216-224.
- CAMPEAU S, NYHUIS TJ, KRYSKOW EM, MASINI CV, BABB JA, SASSE SK, GREENWOOD BN, FLESHNER M, DAY HE. 2010. Stress rapidly increases alpha 1d adrenergic receptor mRNA in the rat dentate gyrus. *Brain Res* 1323:109-118.
- CAMPOS AC, FERREIRA FR, DA SILVA WA JR, GUIMARÃES FS. 2013a. Predator threat stress promotes long lasting anxiety-like behaviors and modulates synaptophysin and CB1 receptors expression in brain areas associated with PTSD symptoms. *Neurosci Lett* 533:34-38.
- CAMPOS AC, PIORINO EM, FERREIRA FR, GUIMARÃES FS. 2013b. Increased nitric oxide-mediated neurotransmission in the medial prefrontal cortex is associated with the long lasting anxiogenic-like effect of predator exposure. *Behav Brain Res* 256:391-397.
- CAVALLI J, BERTOGLIO LJ, CAROBREZ AP. 2009. Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem* 92:512-518.
- CHAU LS, PRAKAPENKA A, FLEMING SA, DAVIS AS, GALVEZ R. 2013. Elevated Arc/Arg 3.1 protein expression in the basolateral amygdala following auditory trace-cued fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 106:127-33.
- CHEN AC, ETKIN A. 2013. Hippocampal network connectivity and activation differentiates post-traumatic stress disorder from generalized anxiety disorder. *Neuropsychopharmacology* 38(10):1889-1898.
- CHEN CC, WILLIAMS CL. 2012. Interactions between epinephrine, ascending vagal fibers, and central noradrenergic systems in modulating memory for emotionally arousing events. *Front Behav Neurosci* 6:35.
- CHIANG LW, SCHWEIZER FE, TSIEN RW, SCHULMAN H. 1994. Nitric oxide synthase expression in single hippocampal neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 27(1):183-188.
- CLAUSTRE Y, LEONETTI M, SANTUCCI V, BOUGAULT I, DESVIGNES C, ROUQUIER L, AUBIN N, KEANE P, BUSCH S, CHEN Y, PALEJWALA V, TOCCI M, YAMDAGNI P, DIDIER M, AVENET P, LE FUR G, OURY-DONAT F, SCATTON B, STEINBERG R. 2008. Effects of the beta3-adrenoceptor (Adrb3) agonist SR58611A (amibegron) on serotonergic and noradrenergic transmission in the rodent: relevance to its antidepressant/anxiolytic-like profile. *Neuroscience* 156(2):353-364
- COHEN H, KAPLAN Z, KORESH O, MATAR MA, GEVA AB, ZOHAR J. 2011. Early post-stressor intervention with propranolol is ineffective in preventing posttraumatic stress responses in an animal model for PTSD. *Eur Neuropsychopharmacol* 21(3):230-240.

- COHEN H, MATAR MA, ZOHAR J. 2014. Maintaining the clinical relevance of animal models in translational studies of post-traumatic stress disorder. *ILAR J* 55(2):233-245.
- COHEN H, RICHTER-LEVIN, G. 2009. Toward Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder. In: SHIROMANI PJ, KEANE TM, LEDOUX JE (Eds.). *Post-Traumatic Stress Disorder: Basic Science and Clinical Practice*. New York: Humana Press.
- CONTI V, RUSSOMANNO G, CORBI G, IZZO V, VECCHIONE C, FILIPPELLI A. 2013. Adrenoreceptors and nitric oxide in the cardiovascular system. *Front Physiol* 4:321.
- CORLETT PR, TAYLOR JR. 2013. The Translational Potential of Memory Reconsolidation. In: ALBERINI CM (Ed). 2013. *Memory reconsolidation*. New York: Academic Press, p.273-292.
- CORLEY MJ, CARUSO MJ, TAKAHASHI LK. 2012. Stress-induced enhancement of fear conditioning and sensitization facilitates extinction-resistant and habituation-resistant fear behaviors in a novel animal model of posttraumatic stress disorder. *Physiol Behav* 105(2):408-416.
- COUGHLIN SS. 2011. Post-traumatic Stress Disorder and Cardiovascular Disease. *Open Cardiovasc Med J* 5:164-170.
- COUSIJN H, RIJPKEMA M, QIN S, VAN MARLE HJ, FRANKE B, HERMANS EJ, VAN WINGEN G, FERNÁNDEZ G. 2010. Acute stress modulates genotype effects on amygdala processing in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(21):9867-9872.
- COUTELLIER L, ARDESTANI PM, SHAMLOO M. 2014. β 1-adrenergic receptor activation enhances memory in Alzheimer's disease model. *Ann Clin Transl Neurol* 1(5):348-360.
- COX DJ, RACCA C, LEBEAU FE. 2008. Beta-adrenergic receptors are differentially expressed in distinct interneuron subtypes in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 509(6):551-565.
- CRESPI F. 2009. Anxiolytics antagonize yohimbine-induced central noradrenergic activity: a concomitant in vivo voltammetry-electrophysiology model of anxiety. *J Neurosci Methods* 180:97-105.
- CRESTANI CC, ALVES FH, RESSTEL LB, CORRÊA FM. 2008. Both alpha1 and alpha2-adrenoceptors mediate the cardiovascular responses to noradrenaline microinjected into the bed nucleus of the stria terminal of rats. *Br J Pharmacol* 153(3):583-590.
- CRUICKSHANK JM, PRICHARD BNC. 1987. *Betablockers in clinical practice*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- CUTLER P. 2003. Protein arrays: the current state-of-the-art. *Proteomics* 3(1):3-18.
- CZERNIAWSKI J, REE F, CHIA C, RAMAMOORTHI K, KUMATA Y, OTTO TA. 2011. The importance of having Arc: expression of the immediate-early gene Arc is required for hippocampus-dependent fear conditioning and blocked by NMDA receptor antagonism. *J Neurosci* 31(31):11200-11207.

- DANG V, MEDINA B, DAS D, MOGHADAM S, MARTIN KJ, LIN B, NAIK P, PATEL D, NOSHENY R, WESSON ASHFORD J, SALEHI A. 2014. Formoterol, a long-acting β_2 adrenergic agonist, improves cognitive function and promotes dendritic complexity in a mouse model of Down syndrome. *Biol Psychiatry* 75(3):179-188.
- DASKALAKIS NP, YEHUDA R, DIAMOND DM. 2013. Animal models in translational studies of PTSD. *Psychoneuroendocrinology* 38:1895-1911.
- DAVIDSON JR. 2004. Use of benzodiazepines in social anxiety disorder, generalized anxiety disorder, and posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry* 65(5):29-33.
- DAVIS AR, SHIELDS AD, BRIGMAN JL, NORCROSS M, MCELLIGOTT ZA, HOLMES A, WINDER DG. 2008. Yohimbine impairs extinction of cocaine-conditioned place preference in an α_2 -adrenergic receptor independent process. *Learn Mem* 15(9):667-676.
- DE DIEGO AM, GANDÍA L, GARCÍA AG. 2008. A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol* 192(2):287-301.
- DE JONG J, WAUBEN P, HUIJBRECHTS I, OOLDERS H, HAFFMANS J. 2010. Doxazosin treatment for posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychopharmacol* 30(1):84-85.
- DE OLIVEIRA ALVARES L, CRESTANI AP, CASSINI LF, HAUBRICH J, SANTANA F, QUILLFELDT JA. 2013. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience* 244:42-48.
- DE OLIVEIRA ALVARES L, EINARSSON EÖ, SANTANA F, CRESTANI AP, HAUBRICH J, CASSINI LF, NADER K, QUILLFELDT JA. 2011. Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus* 22(5):1092-1095.
- DE OLIVEIRA RM, DEL BEL EA, GUIMARÃES FS. 2001. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8):679-685.
- DE QUERVAIN DJ, KOLASSA IT, ERTL V, ONYUT PL, NEUNER F, ELBERT T, PAPASSOTIROPOULOS A. 2007. A deletion variant of the α_2b -adrenoceptor is related to emotional memory in Europeans and Africans. *Nat Neurosci* 10(9):1137-1139.
- DEBIEC J, BUSH DE, LEDOUX JE. 2011. Noradrenergic enhancement of reconsolidation in the amygdala impairs extinction of conditioned fear in rats—a possible mechanism for the persistence of traumatic memories in PTSD. *Depress Anxiety* 28:186-193.
- DEBIEC J, LEDOUX JE. 2004. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neuroscience* 129(2):267-272.
- DEBIEC J. 2012. Memory reconsolidation processes and posttraumatic stress disorder: promises and challenges of translational research. *Biol Psychiatry* 71:284-285.

- DEBOCK F, KURZ J, AZAD SC, PARSONS CG, HAPFELMEIER G, ZIEGLGÄNSBERGER W, RAMMES G. 2003. Alpha2-adrenoreceptor activation inhibits LTP and LTD in the basolateral amygdala: involvement of Gi/o-protein-mediated modulation of Ca²⁺-channels and inwardly rectifying K⁺-channels in LTD. *Eur J Neurosci* 17(7):1411-1424.
- DELGADO MR, OLSSON A, PHELPS EA. 2006. Extending animal models of fear conditioning to humans. *Biol Psychol* 73(1):39-48.
- DEVIETTI TL, KIRKPATRICK BR. 1976. The amnesia gradient: inadequate as evidence for a memory consolidation process. *Science* 194(4263):438-440.
- DIERGAARDE L, SCHOFFELMEER AN, DE VRIES TJ. 2008. Pharmacological manipulation of memory reconsolidation: towards a novel treatment of pathogenic memories. *Eur J Pharmacol* 585(2-3):453-457.
- DIFEDE J, CUKOR J, WYKA K, OLDEN M, HOFFMAN H, LEE FS, ALTEMUS M. 2014. D-cycloserine augmentation of exposure therapy for post-traumatic stress disorder: a pilot randomized clinical trial. *Neuropsychopharmacology* 39(5):1052-1058.
- DO-MONTE FH, ALLENSWORTH M, CAROBREZ AP. 2010. Impairment of contextual conditioned fear extinction after microinjection of alpha-1-adrenergic blocker prazosin into the medial prefrontal cortex. *Behav Brain Res* 211:89-95.
- DO-MONTE FH, KINCHESKI GC, PAVESI E, SORDI R, ASSREUY J, CAROBREZ AP. 2010. Role of beta-adrenergic receptors in the ventromedial prefrontal cortex during contextual fear extinction in rats. *Neurobiol Learn Mem* 94:318-328.
- DO-MONTE FH, SOUZA RR, WONG TT, CAROBREZ AP. 2013. Systemic or intra-prelimbic cortex infusion of prazosin impairs fear memory reconsolidation. *Behav Brain Res* 244:137-141.
- DONOVAN E. 2010. Propranolol use in the prevention and treatment of posttraumatic stress disorder in military veterans: forgetting therapy revisited. *Perspect Biol Med* 53(1):61-74.
- DUDAI Y, EISENBERG M. 2004. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44:93-100.
- DUDAI Y. 2002. *Memory from A to Z: keywords, concepts, and beyond*. Oxford University Press.
- DUDAI Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55:51-86.
- DUDAI Y. 2006. Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr Opin Neurobiol* 16(2):174-178.
- DUDAI Y. 2009. Predicting not to predict too much: how the cellular machinery of memory anticipates the uncertain future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1521):1255-1262.
- DUDAI Y. 2012. The restless engram: consolidations never end. *Annu Rev Neurosci* 35:227-247.

- DUNLOP BW, MANSSON E, GERARDI M. 2012. Pharmacological innovations for posttraumatic stress disorder and medication-enhanced psychotherapy. *Curr Pharm Des* 18(35):5645-5658.
- DUVARCI S, NADER K, LEDOUX JE. 2008. De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala. *Learn Mem* 15(10):747-755.
- DYKMAN RA, ACKERMAN PT, NEWTON JE. 1997. Posttraumatic stress disorder: a sensitization reaction. *Integr Physiol Behav Sci* 32(1):9-18.
- EBRAHIMI S, RASHIDY-POUR A, VAFAEI AA, AKHAVAN MM. 2010. Central beta-adrenergic receptors play an important role in the enhancing effect of voluntary exercise on learning and memory in rat. *Behav Brain Res* 208(1):189-193.
- EDWARDS TM, RICKARD NS. 2007. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. *Neurosci Biobehav Rev* 31(3):413-425.
- EHLERS A, HACKMANN A, MICHAEL T. 2004. Intrusive re-experiencing in post-traumatic stress disorder: phenomenology, theory, and therapy. *Memory* 12:403-415.
- EHLERS A, SUENDERMANN O, BOELLINGHAUS I, VOSSBECK-ELSEBUSCH A, GAMER M, BRIDDON E, MARTIN MW, GLUCKSMAN E. 2010. Heart rate responses to standardized trauma-related pictures in acute posttraumatic stress disorder. *Int J Psychophysiol* 78(1):27-34.
- EINARSSON EÖ, NADER K. 2012. Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem* 19(10):449-452.
- EISENHARDT D, MENZEL R. 2007. Extinction learning, reconsolidation and the internal reinforcement hypothesis. *Neurobiol Learn Mem* 87(2):167-173.
- ELZINGA BM, BREMNER JD. 2002. Are the neural substrates of memory the final common pathway in posttraumatic stress disorder (PTSD)? *J Affect Disord* 70:1-17.
- FAIZI M, BADER PL, TUN C, ENCARNACION A, KLESCHEVNIKOV A, BELICHENKO P, SAW N, PRIESTLEY M, TSIEN RW, MOBLEY WC, SHAMLOO M. 2011. Comprehensive behavioral phenotyping of Ts65Dn mouse model of Down syndrome: activation of β 1-adrenergic receptor by xamoterol as a potential cognitive enhancer. *Neurobiol Dis* 43(2):397-413.
- FANSELOW MS, DONG HW. 2010. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65(1):7-19.
- FANSELOW MS, PONNUSAMY R. 2008. The use of conditioning tasks to model fear and anxiety. In: BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC, GRIEBEL G, NUTT D (Eds.). *Handbook of Anxiety and Fear*. Oxford: Academic Press, p.29-48.
- FANSELOW MS. 1980. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci* 15:177-182.
- FANSELOW MS. 2000. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* 110(1-2):73-81.

- FERRY B, PARROT S, MARIEN M, LAZARUS C, CASSEL JC, MCGAUGH JL. 2014. Noradrenergic influences in the basolateral amygdala on inhibitory avoidance memory are mediated by an action on $\alpha 2$ -adrenoceptors. *Psychoneuroendocrinology* 51C:68-79.
- FERRY B, ROOZENDAAL B, MCGAUGH JL. 1999. Involvement of alpha1-adrenoceptors in the basolateral amygdala in modulation of memory storage. *Eur J Pharmacol* 372:9-16.
- FIGUEROA XF, POBLETE I, FERNÁNDEZ R, PEDEMONTE C, CORTÉS V, HUIDOBRO-TORO JP. 2009. NO production and eNOS phosphorylation induced by epinephrine through the activation of beta-adrenoceptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(1):134-143.
- FITZGERALD PJ, SEEMANN JR, MAREN S. 2014. Can fear extinction be enhanced? A review of pharmacological and behavioral findings. *Brain Res Bull* 105:46-60.
- FLEURKENS P, RINCK M, VAN MINNEN A. 2011. Specificity and generalization of attentional bias in sexual trauma victims suffering from posttraumatic stress disorder. *J Anxiety Disord* 25(6):783-787.
- FLEXNER LB, FLEXNER JB, ROBERTS RB. 1967. Memory in mice analyzed with antibiotics. Antibiotics are useful to study stages of memory and to indicate molecular events which sustain memory. *Science* 155(3768):1377-1383.
- FONT L, CUNNINGHAM CL. 2012. Post-retrieval propranolol treatment does not modulate reconsolidation or extinction of ethanol-induced conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 101(2):222-230.
- FREY U, MORRIS RG. 1997. Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385(6616):533-536.
- FRICKS-GLEASON AN, MARSHALL JF. 2008. Post-retrieval beta-adrenergic receptor blockade: effects on extinction and reconsolidation of cocaine-cue memories. *Learn Mem* 15(9):643-648.
- FUKUSHIMA H, ZHANG Y, ARCHBOLD G, ISHIKAWA R, NADER K, KIDA S. 2014. Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation. *Elife* 3:e02736.
- FÜLLHASE C, SOLER R, WESTERLING-ANDERSSON K, ANDERSSON KE. 2011. Beta3-adrenoceptors in the rat sacral spinal cord and their functional relevance in micturition under normal conditions and in a model of partial urethral obstruction. *Neurol Urodyn* 30(7):1382-1387.
- FULTON D, GRATTON JP, SESSA WC. 2001. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 299(3):818-824.
- FURINI CR, ROSSATO JI, BITENCOURT LL, MEDINA JH, IZQUIERDO I, CAMMAROTA M. 2010. Beta-adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during the consolidation of object recognition long-term memory. *Hippocampus* 20:672-683.
- FUSTER JM. 2008. *The prefrontal cortex*. Londres: Elsevier.

- GADEK-MICHALSKA A, BUGAJSKI J. 2008. Nitric oxide in the adrenergic- and CRH-induced activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Physiol Pharmacol* 59(2):365-378.
- GALEOTTI N, BARTOLINI A, GHELARDINI C. 2004. Alpha-2 agonist-induced memory impairment is mediated by the alpha-2A-adrenoceptor subtype. *Behav Brain Res* 153(2):409-417.
- GAMACHE K, PITMAN RK, NADER K. 2012. Preclinical evaluation of reconsolidation blockade by clonidine as a potential novel treatment for posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 37:2789-2796.
- GARCIA-DELATORRE P, RODRÍGUEZ-ORTIZ CJ, BALDERAS I, BERMÚDEZ-RATTONI F. 2010. Differential participation of temporal structures in the consolidation and reconsolidation of taste aversion extinction. *Eur J Neurosci* 32:1018-1023.
- GAZARINI L, STERN CA, BERTOGLIO LJ. 2011. Protein synthesis in dorsal hippocampus supports the drug tolerance induced by prior elevated plus-maze experience. *Neuroscience* 179:179-187.
- GELINAS JN, NGUYEN PV. 2005. Beta-adrenergic receptor activation facilitates induction of a protein synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *J Neurosci* 25:3294-3303.
- GERACIOTI TD Jr, BAKER DG, EKHATOR NN, WEST SA, HILL KK, BRUCE AB, SCHMIDT D, ROUNDS-KUGLER B, YEHUDA R, KECK PE JR, KASCKOW JW. 2001. CSF norepinephrine concentrations in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 158(8):1227-1230.
- GERACIOTI TD Jr, BAKER DG, KASCKOW JW, STRAWN JR, JEFFREY MULCHAHEY J, DASHEVSKY BA, HORN PS, EKHATOR NN. 2008. Effects of trauma-related audiovisual stimulation on cerebrospinal fluid norepinephrine and corticotropin-releasing hormone concentrations in post-traumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 33(4):416-424.
- GERSHMAN SJ. 2014. The penumbra of learning: A statistical theory of synaptic tagging and capture. *Network* 25(3):97-115.
- GHOSH S, CHATTARJI S. 2015. Neuronal encoding of the switch from specific to generalized fear. *Nat Neurosci* 18(1):112-120.
- GIBBS ME, HUTCHINSON DS, SUMMERS RJ. 2008. Role of beta-adrenoceptors in memory consolidation: beta3-adrenoceptors act on glucose uptake and beta2-adrenoceptors on glycogenolysis. *Neuropsychopharmacology* 33(10):2384-2397.
- GIBBS ME, MAKSEL D, GIBBS Z, HOU X, SUMMERS RJ, SMALL DH. 2010. Memory loss caused by beta-amyloid protein is rescued by a beta(3)-adrenoceptor agonist. *Neurobiol Aging* 31(4):614-624.
- GIBBS ME, SUMMERS RJ. 2000. Separate roles for beta2- and beta3-adrenoceptors in memory consolidation. *Neuroscience* 95(3):913-922.
- GIBBS ME, SUMMERS RJ. 2003. Alpha 2-adrenoceptors in the basal ganglia have a role in memory consolidation and reinforcement. *Neuropharmacology* 45(3):355-367.

- GIBBS ME, SUMMERS RJ. 2005. Contrasting roles for beta1, beta2 and beta3-adrenoceptors in memory formation in the chick. *Neuroscience* 131(1):31-42.
- GIESE KP, MIZUNO K. 2013. The roles of protein kinases in learning and memory. *Learn Mem* 20(10):540-552.
- GILES J. 2005. Beta-blockers tackle memories of horror. *Nature* 436(7050):448-449.
- GILMARTIN MR, BALDERSTON NL, HELMSTETTER FJ. 2014. Prefrontal cortical regulation of fear learning. *Trends Neurosci* 37(8):455-464.
- GOLD PE, DELANOY RL, MERRIN J. 1984. Modulation of long-term potentiation by peripherally administered amphetamine and epinephrine. *Brain Res* 305(1):103-107.
- GOLD PE, VAN BUSKIRK R, HAYCOCK JW. 1977. Effects of posttraining epinephrine injections on retention of avoidance training in mice. *Behav Biol* 20(2):197-204.
- GOLD PE, VAN BUSKIRK R. 1978a. Effects of alpha- and beta-adrenergic receptor antagonists on post-trial epinephrine modulation of memory: relationship to post-training brain norepinephrine concentrations. *Behav Biol* 24(2):168-184.
- GOLD PE, VAN BUSKIRK R. 1978b. Posttraining brain norepinephrine concentrations: correlation with retention performance of avoidance training and with peripheral epinephrine modulation of memory processing. *Behav Biol* 23:509-520.
- GOLD PE, VAN BUSKIRK RB. 1975. Facilitation of time-dependent memory processes with posttrial epinephrine injections. *Behav Biol* 13: 145-153.
- GOLD PE, WELSH KA. 1987. Regional brain catecholamines and memory: effects of footshock, amygdala implantation, and stimulation. *Behav Neural Biol* 47(2):116-129.
- GOLD PE. 2014. Regulation of memory - from the adrenal medulla to liver to astrocytes to neurons. *Brain Res Bull* 105:25-35.
- GOOSENS KA. 2011. Hippocampal regulation of aversive memories. *Curr Opin Neurobiol* 21(3):460-466.
- GOVERS R, RABELINK TJ. 2001. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280(2):193-206.
- GOZZANI JL, IZQUIERDO I. 1976. Possible peripheral adrenergic and central dopaminergic influences in memory consolidation. *Psychopharmacology* 49:109-111.
- GRANADO N, ORTIZ O, SUÁREZ LM, MARTÍN ED, CEÑA V, SOLÍS JM, MORATALLA R. 2008. D1 but not D5 dopamine receptors are critical for LTP, spatial learning, and LTP-Induced arc and zif268 expression in the hippocampus. *Cereb Cortex* 18(1):1-12.
- GREENBERG T, CARLSON JM, CHA J, HAJCAK G, MUJICA-PARODI LR. 2013. Ventromedial prefrontal cortex reactivity is altered in generalized anxiety disorder during fear generalization. *Depress Anxiety* 30(3):242-250.

- GUIMARÃES FS, BEJAMINI V, MOREIRA FA, AGUIAR DC, DE LUCCA AC. 2005. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci Biobehav Rev* 29(8):1313-1322.
- GUITTON MJ, DUDAI Y. 2004. Anxiety-like state associates with taste to produce conditioned taste aversion. *Biol Psychiatry* 56:901-904.
- GUITTON MJ, KLIN Y, DUDAI Y. 2008. Taste-dependent sociophobia: when food and company do not mix. *Behav Brain Res* 191(2):148-152.
- GUO NN, LI BM. 2007. Cellular and subcellular distributions of beta1- and beta2-adrenoceptors in the CA1 and CA3 regions of the rat hippocampus. *Neuroscience* 146(1):298-305.
- GUZMÁN-RAMOS K, OSORIO-GÓMEZ D, MORENO-CASTILLA P, BERMÚDEZ-RATTONI F. 2012. Post-acquisition release of glutamate and norepinephrine in the amygdala is involved in taste-aversion memory consolidation. *Learn Mem* 19:231-238.
- GUZOWSKI JF, LYFORD GL, STEVENSON GD, HOUSTON FP, MCGAUGH JL, WORLEY PF, BARNES CA. 2000. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20(11):3993-4001.
- GUZOWSKI JF, SETLOW B, WAGNER EK, MCGAUGH JL. 2001. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci* 21(14):5089-5098.
- HAAPALINNA A, SIRVIÖ J, LAMMINTAUSTA R. 1998. Facilitation of cognitive functions by a specific alpha2-adrenoceptor antagonist, atipamezole. *Eur J Pharmacol* 347(1):29-40.
- HAGENA H, MANAHAN-VAUGHAN D. 2012. Learning-facilitated long-term depression and long-term potentiation at mossy fiber-CA3 synapses requires activation of β -adrenergic receptors. *Front Integr Neurosci* 6:23.
- HAGGERTY DC, GLYKOS V, ADAMS NE, LEBEAU FE. 2013. Bidirectional modulation of hippocampal gamma (20-80 Hz) frequency activity in vitro via alpha(α)- and beta(β)-adrenergic receptors (AR). *Neuroscience* 253:142-154.
- HANSEN N, MANAHAN-VAUGHAN D. 2014. Locus Coeruleus Stimulation Facilitates Long-Term Depression in the Dentate Gyrus That Requires Activation of β -Adrenergic Receptors. *Cereb Cortex* [No prelo].
- HARE GM, WORRALL JM, BAKER AJ, LIU E, SIKICH N, MAZER CD. 2006. Beta2 adrenergic antagonist inhibits cerebral cortical oxygen delivery after severe haemodilution in rats. *Br J Anaesth* 97(5):617-623.
- HARLEY C. 1991. Noradrenergic and locus coeruleus modulation of the perforant path-evoked potential in rat dentate gyrus supports a role for the locus coeruleus in attentional and memorial processes. *Prog Brain Res* 88:307-321.

- HARLEY CW. 1987. A role for norepinephrine in arousal, emotion and learning?: limbic modulation by norepinephrine and the Kety hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 11:419-458.
- HARLEY CW. 2007. Norepinephrine and the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:299-318.
- HAROONI HE, NAGHDI N, SEPEHRI H, ROHANI AH. 2009. The role of hippocampal nitric oxide (NO) on learning and immediate, short- and long-term memory retrieval in inhibitory avoidance task in male adult rats. *Behav Brain Res* 201(1):166-172.
- HARRIS EW, GANONG AH, COTMAN CW. 1984. Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res* 323(1):132-137.
- HARTUNG JE, CISZEK BP, NACKLEY AG. 2014. β 2- and β 3-adrenergic receptors drive COMT-dependent pain by increasing production of nitric oxide and cytokines. *Pain* 155(7):1346-1355.
- HARVEY BH, OOSTHUIZEN F, BRAND L, WEGENER G, STEIN DJ. 2004. Stress-restress evokes sustained iNOS activity and altered GABA levels and NMDA receptors in rat hippocampus. *Psychopharmacology* 175(4):494-502.
- HAVEKES R, CANTON DA, PARK AJ, HUANG T, NIE T, DAY JP, GUERCIO LA, GRIMES Q, LUCZAK V, GELMAN IH, BAILLIE GS, SCOTT JD, ABEL T. 2012. Gravin orchestrates protein kinase A and β 2-adrenergic receptor signaling critical for synaptic plasticity and memory. *J Neurosci* 32(50):18137-18149.
- HAWKINS EJ, MALTE CA, GROSSBARD J, SAXON AJ, IMEL ZE, KIVLAHAN DR. 2013. Comparative safety of benzodiazepines and opioids among veterans affairs patients with posttraumatic stress disorder. *J Addict Med* 7(5):354-362.
- HEBB DO. 1949. *The Organisation of Behaviour*. New York: Wiley.
- HERMANS EJ, BATTAGLIA FP, ATSAK P, DE VOOGD LD, FERNÁNDEZ G, ROOZENDAAL B. 2014. How the amygdala affects emotional memory by altering brain network properties. *Neurobiol Learn Mem* 112:2-16.
- HILLMAN KL, DOZE VA, PORTER JE. 2005. Functional characterization of the beta-adrenergic receptor subtypes expressed by CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* 314(2):561-567.
- HILLMAN KL, KNUDSON CA, CARR PA, DOZE VA, PORTER JE. 2005. Adrenergic receptor characterization of CA1 hippocampal neurons using real time single cell RT-PCR. *Brain Res Mol Brain Res* 139(2):267-276.
- HOFMANN SG, FANG A, GUTNER CA. 2014. Cognitive enhancers for the treatment of anxiety disorders. *Restor Neurol Neurosci* 32(1):183-195.
- HOFMANN SG, WU JQ, BOETTCHER H. 2013. D-Cycloserine as an augmentation strategy for cognitive behavioral therapy of anxiety disorders. *Biol Mood Anxiety Disord* 3(1):11.
- HOGUE EA, WORTHINGTON JJ, NAGURNEY JT, CHANG Y, KAY EB, FETEROWSKI CM, KATZMAN AR, GOETZ JM, ROSASCO ML, LASKO NB, ZUSMAN RM, POLLACK MH, ORR SP, PITMAN RK. 2012. Effect of

- acute posttrauma propranolol on PTSD outcome and physiological responses during script-driven imagery. *CNS Neurosci Ther* 18:21-27.
- HOLLOWAY CM, MCINTYRE CK. 2011. Post-training disruption of Arc protein expression in the anterior cingulate cortex impairs long-term memory for inhibitory avoidance training. *Neurobiol Learn Mem* 95(4):425-432.
- HOLLOWAY-ERICKSON CM, MCREYNOLDS JR, MCINTYRE CK. 2012. Memory-enhancing intra-basolateral amygdala infusions of clenbuterol increase Arc and CaMKII α protein expression in the rostral anterior cingulate cortex. *Front Behav Neurosci* 6:17.
- HOLMES A, QUIRK GJ. 2010. Pharmacological facilitation of fear extinction and the search for adjunct treatments for anxiety disorders--the case of yohimbine. *Trends Pharmacol Sci* 31:2-7.
- HONG I, KIM J, KIM J, LEE S, KO HG, NADER K, KAANG BK, TSIEN RW, CHOI S. 2013. AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(20):8218-8223.
- HOOVER WB, VERTES RP. 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct* 212(2):149-179.
- HOU LQ, LIU S, XIONG KR. 2013. Effects of electroacupuncture on hippocampal nNOS expression in rats of post-traumatic stress disorder model. *Zhongguo Zhen Jiu* 33(7):632-636.
- HUANG AM, LEE EH. 1995. Role of hippocampal nitric oxide in memory retention in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 50(3):327-332.
- HUBBARD JW, PFISTER SL, BIEDIGER AM, HERZIG TC, KEETON TK. 1988. The pharmacokinetic properties of yohimbine in the conscious rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337:583-587.
- HUTCHINSON DS, BENGTTSSON T, EVANS BA, SUMMERS RJ. 2002. Mouse beta 3 α - and beta 3 β -adrenoceptors expressed in Chinese hamster ovary cells display identical pharmacology but utilize distinct signalling pathways. *Br J Pharmacol* 135(8):1903-1914.
- IKEGAYA Y, NAKANISHI K, SAITO H, ABE K. 1997. Amygdala beta-noradrenergic influence on hippocampal long-term potentiation in vivo. *Neuroreport* 8(14):3143-3146.
- IVANOV A, ASTON-JONES G. 1995. Extranuclear dendrites of locus coeruleus neurons: activation by glutamate and modulation of activity by alpha adrenoceptors. *J Neurophysiol* 74:2427-2436.
- IWASE K, IYAMA K, AKAGI K, YANO S, FUKUNAGA K, MIYAMOTO E, MORI M, TAKIGUCHI M. 1998. Precise distribution of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the rat brain revealed by non-radioisotopic in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* 53(1-2):1-12.
- IZQUIERDO I, DA CUNHA C, ROSAT R, JERUSALINSKY D, FERREIRA MB, MEDINA JH. 1992. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol* 58(1):16-26.

- IZQUIERDO I, MEDINA JH, VIANNA MR, IZQUIERDO LA, BARROS DM. 1999. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103(1):1-11.
- IZQUIERDO I, MEDINA JH. 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68(3):285-316.
- IZUMI Y, ZORUMSKI CF. 1999. Norepinephrine promotes long-term potentiation in the adult rat hippocampus in vitro. *Synapse* 31(3):196-202.
- JAROME TJ, THOMAS JS, LUBIN FD. 2014. The epigenetic basis of memory formation and storage. *Prog Mol Biol Transl Sci* 128:1-27.
- JHAVERI DJ, MACKAY EW, HAMLIN AS, MARATHE SV, NANDAM LS, VAIDYA VA, BARTLETT PF. 2010. Norepinephrine directly activates adult hippocampal precursors via beta3-adrenergic receptors. *J Neurosci* 30(7):2795-2806.
- JJ JZ, WANG XM, LI BM. 2003. Deficit in long-term contextual fear memory induced by blockade of beta-adrenoceptors in hippocampal CA1 region. *Eur J Neurosci* 17(9):1947-1952.
- JJ JZ, ZHANG XH, LI BM. 2003. Deficient spatial memory induced by blockade of beta-adrenoceptors in the hippocampal CA1 region. *Behav Neurosci* 117(6):1378-1384.
- JOËLS M, BARAM TZ. 2009. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 10(6):459-466.
- JOËLS M, FERNANDEZ G, ROOZENDAAL B. 2011. Stress and emotional memory: a matter of timing. *Trends Cogn Sci* 15:280-288.
- JOHANSEN JP, CAIN CK, OSTROFF LE, LEDOUX JE. 2011. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* 147(3):509-524.
- JOHNSTONE VP, RAYMOND CR. 2011. A protein synthesis and nitric oxide-dependent presynaptic enhancement in persistent forms of long-term potentiation. *Learn Mem* 18(10):625-633.
- JOINER ML, LISÉ MF, YUEN EY, KAM AY, ZHANG M, HALL DD, MALIK ZA, QIAN H, CHEN Y, ULRICH JD, BURETTE AC, WEINBERG RJ, LAW PY, EL-HUSSEINI A, YAN Z, HELL JW. 2010. Assembly of a beta2-adrenergic receptor--GluR1 signalling complex for localized cAMP signalling. *EMBO J* 29(2):482-495.
- JOVANOVIĆ T, KAZAMA A, BACHEVALIER J, DAVIS M. 2012. Impaired safety signal learning may be a biomarker of PTSD. *Neuropharmacology* 62(2):695-704.
- JOVANOVIĆ T, NORRHOLM SD, FENNELL JE, KEYES M, FIALLOS AM, MYERS KM, DAVIS M, DUNCAN EJ. 2009. Posttraumatic stress disorder may be associated with impaired fear inhibition: relation to symptom severity. *Psychiatry Res* 167:151-160.
- JURGENS CW, RAU KE, KNUDSON CA, KING JD, CARR PA, PORTER JE, DOZE VA. 2005. Beta1 adrenergic receptor-mediated enhancement of hippocampal CA3 network activity. *J Pharmacol Exp Ther* 314(2):552-560.

- KAANG BK, CHOI JH. 2011. Protein Degradation during Reconsolidation as a Mechanism for Memory Reorganization. *Front Behav Neurosci* 5:2.
- KAOUANE N, PORTE Y, VALLÉE M, BRAYDA-BRUNO L, MONS N, CALANDREAU L, MARIGHETTO A, PIAZZA PV, DESMEDT A. 2012. Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. *Science* 335:1510-1513.
- KELLEY JB, BALDA MA, ANDERSON KL, ITZHAK Y. 2009. Impairments in fear conditioning in mice lacking the nNOS gene. *Learn Mem* 16(6):371-378.
- KETY SS. 1972. The possible role of the adrenergic systems of the cortex in learning. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 50: 376-389.
- KHAN SM, SLENO R, GORA S, ZYLBERGOLD P, LAVERDURE JP, LABBÉ JC, MILLER GJ, HÉBERT TE. 2013. The expanding roles of G $\beta\gamma$ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacol Rev* 65(2):545-577.
- KHEIRBEK MA, KLEMENHAGEN KC, SAHAY A, HEN R. 2012. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nat Neurosci* 15:1613-1620.
- KIBLER JL, TURSICH M, MA M, MALCOLM L, GREENBARG R. 2014. Metabolic, autonomic and immune markers for cardiovascular disease in posttraumatic stress disorder. *World J Cardiol* 6(6):455-461.
- KIBLER JL. 2009. Posttraumatic stress and cardiovascular disease risk. *J Trauma Dissociation* 10(2):135-150.
- KIM JJ, JUNG MW. 2006. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev* 30(2):188-202.
- KLEIM B, EHLERS A. 2008. Reduced autobiographical memory specificity predicts depression and posttraumatic stress disorder after recent trauma. *J Consult Clin Psychol* 76(2):231-242.
- KLEPPISCH T, FEIL R. 2009. cGMP signalling in the mammalian brain: role in synaptic plasticity and behaviour. *Handb Exp Pharmacol* 191:549-579.
- KLUMPERS F, DENYS D, KENEMANS JL, GRILLON C, VAN DER AART J, BAAS JM. 2012. Testing the effects of Δ^9 -THC and D-cycloserine on extinction of conditioned fear in humans. *J Psychopharmacol* 26(4):471-478.
- KNIERIM JJ, LEE I, HARGREAVES EL. 2006. Hippocampal place cells: parallel input streams, subregional processing, and implications for episodic memory. *Hippocampus* 16(9):755-764.
- KNOWLTON BJ, FANSELOW MS. 1998. The hippocampus, consolidation and on-line memory. *Curr Opin Neurobiol* 8(2):293-296.
- KNYAZEVA GG, NIKIFOROV AF. 1976. Analysis of the role of central noradrenergic structures in memory trace recall. *Neurosci Behav Physiol* 7(3):196-200.
- KOBAYASHI K, YASOSHIMA Y. 2001. The central noradrenaline system and memory consolidation. *Neuroscientist* 7(5):371-376.

- KORB E, FINKBEINER S. 2011. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends Neurosci* 34(11):591-598.
- KOROL DL, GOLD PE. 2008. Epinephrine converts long-term potentiation from transient to durable form in awake rats. *Hippocampus* 18:81-91.
- KOSTEK JA, BECK KD, GILBERTSON MW, ORR SP, PANG KC, SERVATIUS RJ, MYERS CE. 2014. Acquired Equivalence in U.S. Veterans With Symptoms of Posttraumatic Stress: Reexperiencing Symptoms Are Associated With Greater Generalization. *J Trauma Stress* 27(6):717-720.
- KOU R, MICHEL T. 2007. Epinephrine regulation of the endothelial nitric-oxide synthase: roles of RAC1 and beta3-adrenergic receptors in endothelial NO signaling. *J Biol Chem* 282(45):32719-32729.
- KROON JA, CAROBREZ AP. 2009. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. *Neurobiol Learn Mem* 91:32-40.
- KRYSTAL JH, NEUMEISTER A. 2009. Noradrenergic and serotonergic mechanisms in the neurobiology of posttraumatic stress disorder and resilience. *Brain Res* 1293:13-23.
- KRYUKOV VI. 2012. Towards a unified model of pavlovian conditioning: short review of trace conditioning models. *Cogn Neurodyn* 6(5):377-398.
- KUBO T, MISU Y. 1981. Pharmacological characterisation of the alpha-adrenoceptors responsible for a decrease of blood pressure in the nucleus tractus solitarii of the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 317(2):120-125.
- KWAPIS JL, WOOD MA. 2014. Epigenetic mechanisms in fear conditioning: implications for treating post-traumatic stress disorder. *Trends Neurosci* 37(12):706-720.
- LAING M, BASHIR ZI. 2014. β -Adrenoceptors and synaptic plasticity in the perirhinal cortex. *Neuroscience* 273:163-173.
- LALUMIERE RT, BUEN TV, MCGAUGH JL. 2003. Post-training intrabasolateral amygdala infusions of norepinephrine enhance consolidation of memory for contextual fear conditioning. *J Neurosci* 23: 6754-6758.
- LALUMIERE RT, NIEHOFF KE, KALIVAS PW. 2010. The infralimbic cortex regulates the consolidation of extinction after cocaine self-administration. *Learn Mem* 17(4):168-175.
- LANDS AM, ARNOLD A, MCAULIFF JP, LUDUENA FP, BROWN TG Jr. 1967. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214(5088):597-598.
- LANGER SZ. 1974. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol* 23(13):1793-1800.
- LAWFORD BR, MORRIS CP, SWAGELL CD, HUGHES IP, YOUNG RM, VOISEY J. 2013. NOS1AP is associated with increased severity of PTSD and depression in untreated combat veterans. *J Affect Disord* 147(1-3):87-93.
- LAZZARO SC, HOU M, CUNHA C, LEDOUX JE, CAIN CK. 2010. Antagonism of lateral amygdala alpha1-adrenergic receptors facilitates fear conditioning and long-term potentiation. *Learn Mem* 17:489-493.

- LEDOUX JE. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.
- LEE JL, EVERITT BJ, THOMAS KL. 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304:839-843.
- LEE JL, FLAVELL CR. 2014. Inhibition and enhancement of contextual fear memory destabilization. *Front Behav Neurosci* 8:144.
- LEE JL, HYND S RE. 2013. Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 23(3):233-244.
- LEE JL, MILTON AL, EVERITT BJ. 2006. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J Neurosci* 26:10051-10056.
- LEE JL. 2009. Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci* 32(8):413-420.
- LEE JL. 2010. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front Behav Neurosci* 4:168.
- LEMON N, AYDIN-ABIDIN S, FUNKE K, MANAHAN-VAUGHAN D. 2009. Locus coeruleus activation facilitates memory encoding and induces hippocampal LTD that depends on beta-adrenergic receptor activation. *Cereb Cortex* 19(12):2827-2837.
- LERANTH C, HAJSZAN T. 2007. Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:63-84.
- LEVY-GIGI E, SZABO C, RICHTER-LEVIN G, KÉRI S. 2015. Reduced Hippocampal Volume Is Associated With Overgeneralization of Negative Context in Individuals With PTSD. *Neuropsychology* 29(1):151-161.
- LEWIS DJ. 1979. Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol Bull* 86:1054-1083
- LI CJ, ZHOU M, LI HG, LV Q, XU XL, GUO LJ. 2013b. Clonidine suppresses the induction of long-term potentiation by inhibiting HCN channels at the Schaffer collateral-CA1 synapse in anesthetized adult rats. *Cell Mol Neurobiol* 33(8):1075-1086.
- LI L, CARTER J, GAO X, WHITEHEAD J, TOURTELLOTTE WG. 2005. The neuroplasticity-associated arc gene is a direct transcriptional target of early growth response (Egr) transcription factors. *Mol Cell Biol* 25(23):10286-10300.
- LI Q, LIU XS, ZENG QW, XUE QS, CAO XH, LIU J, REN Y, YU BW. 2011. Post-training intra-basolateral amygdala infusions of norepinephrine block sevoflurane-induced impairment of memory consolidation and activity-regulated cytoskeletal protein expression inhibition in rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 96(3):492-497.
- LI S, JIN M, ZHANG D, YANG T, KOEGLSPERGER T, FU H, SELKOE DJ. 2013c. Environmental novelty activates β 2-adrenergic signaling to prevent the impairment of hippocampal LTP by A β oligomers. *Neuron* 77(5):929-941.
- LI Y, MELONI EG, CARLEZON WA JR, MILAD MR, PITMAN RK, NADER K, BOLSHAKOV VY. 2013a. Learning and reconsolidation

- implicate different synaptic mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(12):4798-4803.
- LIANG KC, JULER RG, MCGAUGH JL. 1986. Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. *Brain Res* 368(1):125-133.
- LIBERZON I, ABELSON JL, FLAGEL SB, RAZ J, YOUNG EA. 1999. Neuroendocrine and psychophysiologic responses in PTSD: a symptom provocation study. *Neuropsychopharmacology* 21:40-50.
- LIN Y, SMRCKA AV. 2011. Understanding molecular recognition by G protein $\beta\gamma$ subunits on the path to pharmacological targeting. *Mol Pharmacol* 80(4):551-557.
- LIPOV E, KELZENBERG B. 2012. Sympathetic system modulation to treat post-traumatic stress disorder (PTSD): a review of clinical evidence and neurobiology. *J Affect Disord* 142(1-3):1-5.
- LIU P, ZHENG Y, SMITH PF, BILKEY DK. 2003. Changes in NOS protein expression and activity in the rat hippocampus, entorhinal and postrhinal cortices after unilateral electrolytic perirhinal cortex lesions. *Hippocampus* 13(5):561-571.
- LIU Y, LIANG X, REN WW, LI BM. 2014. Expression of $\beta 1$ - and $\beta 2$ -adrenoceptors in different subtypes of interneurons in the medial prefrontal cortex of mice. *Neuroscience* 257:149-157.
- LONERGAN MH, OLIVERA-FIGUEROA LA, PITMAN RK, BRUNET A. 2013. Propranolol's effects on the consolidation and reconsolidation of long-term emotional memory in healthy participants: a meta-analysis. *J Psychiatry Neurosci* 38(4):222-231.
- LUYTEN L, VANSTEENWEGEN D, VAN KUYCK K, GABRIËLS L, NUTTIN B. 2011. Contextual conditioning in rats as an animal model for generalized anxiety disorder. *Cogn Affect Behav Neurosci* 11(2):228-244.
- LYNCH G, REX CS, GALL CM. 2007. LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. *Neuropharmacology* 52(1):12-23.
- MAC CALLUM PE, HEBERT M, ADAMEC RE, BLUNDELL J. 2014. Systemic inhibition of mTOR kinase via rapamycin disrupts consolidation and reconsolidation of auditory fear memory. *Neurobiol Learn Mem* 112:176-185.
- MACKENZIE L, NALIVAICO E, BEIG MI, DAY TA, WALKER FR. 2010. Ability of predator odour exposure to elicit conditioned versus sensitised post traumatic stress disorder-like behaviours, and forebrain deltaFosB expression, in rats. *Neuroscience* 169(2):733-742.
- MACTUTUS CF, RICCIO DC, FERREK JM. 1979. Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. *Science* 204(4399):1319-1320.
- MALDONADO NM, MARTIJENA ID, MOLINA VA. 2011. Facilitating influence of stress on the consolidation of fear memory induced by a weak training: reversal by midazolam pretreatment. *Behav Brain Res* 225:77-84.

- MALIN EL, MCGAUGH JL. 2006. Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(6):1959-1963.
- MAMIYA N, FUKUSHIMA H, SUZUKI A, MATSUYAMA Z, HOMMA S, FRANKLAND PW, KIDA S. 2009. Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J Neurosci* 29(2):402-413.
- MAREN S, PHAN KL, LIBERZON I. 2013. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci* 14:417-428.
- MAROUN M, AKIRAV I. 2009. Differential involvement of dopamine D1 receptor and MEK signaling pathway in the ventromedial prefrontal cortex in consolidation and reconsolidation of recognition memory. *Learn Mem* 16:243-247.
- MARSHALL RD, BEEBE KL, OLDHAM M, ZANINELLI R. 2001. Efficacy and safety of paroxetine treatment for chronic PTSD: a fixed-dose, placebo-controlled study. *Am J Psychiatry* 158(12):1982-1988.
- MARTÍNEZ-CUESTA MA, MORENO L, PIQUÉ JM, BOSCH J, RODRIGO J, ESPLUGUES JV. 1996. Nitric oxide-mediated beta 2-adrenoceptor relaxation is impaired in mesenteric veins from portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 111(3):727-735.
- MARZO A, BAI J, OTANI S. 2009. Neuroplasticity regulation by noradrenaline in mammalian brain. *Curr Neuropharmacol* 7(4):286-295.
- MATTILA M, SEPPALA T, MATTILA MJ. 1988. Anxiogenic effect of yohimbine in healthy subjects: comparison with caffeine and antagonism by clonidine and diazepam. *Int Clin Psychopharmacol* 3(3):215-229.
- MCCARTY R, GOLD PE. 1981. Plasma catecholamines: effects of footshock level and hormonal modulators of memory storage. *Horm Behav* 15(2):168-182.
- MCCUNE SK, VOIGT MM, HILL JM. 1993. Expression of multiple alpha adrenergic receptor subtype messenger RNAs in the adult rat brain. *Neuroscience* 57(1):143-151.
- MCFARLANE AC, YEHUDA R, CLARK CR. 2002. Biologic models of traumatic memories and post-traumatic stress disorder. The role of neural networks. *Psychiatr Clin North Am* 25(2):253-270.
- MCGAUGH JL, ROOZENDAAL B. 2002. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 12:205-210.
- MCGAUGH JL. 1983. Hormonal influences on memory. *Annu Rev Psychol* 34:297-323
- MCGAUGH JL. 2000. Memory--a century of consolidation. *Science* 287(5451):248-251.
- MCGUIRE JF, LEWIN AB, STORCH EA. 2014. Enhancing exposure therapy for anxiety disorders, obsessive-compulsive disorder and post-traumatic stress disorder. *Expert Rev Neurother* 14(8):893-910.

- MCINTYRE CK, MCGAUGH JL, WILLIAMS CL. 2012. Interacting brain systems modulate memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 36(7):1750-1762.
- MCINTYRE CK, MIYASHITA T, SETLOW B, MARJON KD, STEWARD O, GUZOWSKI JF, MCGAUGH JL. 2005. Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(30):10718-10723.
- MCREYNOLDS JR, ANDERSON KM, DONOWHO KM, MCINTYRE CK. 2014. Noradrenergic actions in the basolateral complex of the amygdala modulate Arc expression in hippocampal synapses and consolidation of aversive and non-aversive memory. *Neurobiol Learn Mem* 115:49-57.
- MCREYNOLDS JR, DONOWHO K, ABDI A, MCGAUGH JL, ROOZENDAAL B, MCINTYRE CK. 2010. Memory-enhancing corticosterone treatment increases amygdala norepinephrine and Arc protein expression in hippocampal synaptic fractions. *Neurobiol Learn Mem* 93(3):312-321.
- MEDINA JH, IZQUIERDO I. 1995. Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 21(2):185-194.
- MELLMAN TA, BROWN DD, JENIFER ES, HIPOLITO MM, RANDALL OS. 2009. Posttraumatic stress disorder and nocturnal blood pressure dipping in young adult African Americans. *Psychosom Med* 71(6):627-630.
- MERLO E, MILTON AL, GOOZÉE ZY, THEOBALD DE, EVERITT BJ. 2014. Reconsolidation and extinction are dissociable and mutually exclusive processes: behavioral and molecular evidence. *J Neurosci* 34(7):2422-2431.
- MEYERBROEKER K, POWERS MB, VAN STEGEREN A, EMMELKAMP PM. 2012. Does yohimbine hydrochloride facilitate fear extinction in virtual reality treatment of fear of flying? A randomized placebo-controlled trial. *Psychother Psychosom* 81(1):29-37.
- MILAD MR, PITMAN RK, ELLIS CB, GOLD AL, SHIN LM, LASKO NB, ZEIDAN MA, HANDWERGER K, ORR SP, RAUCH SL. 2009. Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 66:1075-1082.
- MILAD MR, ROSENBAUM BL, SIMON NM. 2014. Neuroscience of fear extinction: Implications for assessment and treatment of fear-based and anxiety related disorders. *Behav Res Ther* 62:17-23.
- MILLER MM, MCEWEN BS. 2006. Establishing an agenda for translational research on PTSD. *Ann NY Acad Sci* 1071:294-312.
- MILLER RR, MATZEL LD. 2000. Memory involves far more than 'consolidation'. *Nat Rev Neurosci* 1(3):214-216.
- MILTON AL, LEE JL, EVERITT BJ. 2008. Reconsolidation of appetitive memories for both natural and drug reinforcement is dependent on {beta}-adrenergic receptors. *Learn Mem* 15:88-92.
- MILTON AL, MERLO E, RATANO P, GREGORY BL, DUMBRECK JK, EVERITT BJ. 2013. Double dissociation of the requirement for GluN2B- and

- GluN2A-containing NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory. *J Neurosci* 33(3):1109-1115.
- MILTON AL. 2013. Drink, drugs and disruption: memory manipulation for the treatment of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 23(4):706-712.
- MINNEMAN KP, HAN C, ABEL PW. 1988. Comparison of alpha 1-adrenergic receptor subtypes distinguished by chlorethylclonidine and WB 4101. *Mol Pharmacol* 33(5):509-514.
- MISANIN JR, MILLER RR, LEWIS DJ. 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160(3827):554-555.
- MIZUMORI SJ, RAGOZZINO KE, COOPER BG, LEUTGEB S. 1999. Hippocampal representational organization and spatial context. *Hippocampus* 9(4):444-451.
- MONCADA D, BALLARINI F, MARTINEZ MC, FREY JU, VIOLA H. 2011. Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(31):12931-12936.
- MONDACA M, HERNÁNDEZ A, PÉREZ H, VALLADARES L, SIERRALTA W, FERNÁNDEZ V, SOTO-MOYANO R. 2004. Alpha2-adrenoceptor modulation of long-term potentiation elicited in vivo in rat occipital cortex. *Brain Res* 1021:292-296.
- MOOSAVI M, ABBASI L, ZARIFKAR A, RASTEGAR K. 2014. The role of nitric oxide in spatial memory stages, hippocampal ERK and CaMKII phosphorylation. *Pharmacol Biochem Behav* 122:164-172.
- MORGADO-BERNAL I. 2011. Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data. *Neuroscience* 176:12-19.
- MORGAN CA 3rd, GRILLON C, SOUTHWICK SM, NAGY LM, DAVIS M, KRYSZAL JH, CHARNEY DS. 1995. Yohimbine facilitated acoustic startle in combat veterans with post-traumatic stress disorder. *Psychopharmacology* 117(4):466-471.
- MORRIS RG. 2006. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci* 23(11):2829-2846.
- MORRIS RW, BOUTON ME. 2007. The effect of yohimbine on the extinction of conditioned fear: a role for context. *Behav Neurosci* 121:501-514.
- MÜLLER GE, PILZECKER A. 1900. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss. *Zeitschrift fuer Psychologie* 1:1-288.
- MURAVIEVA EV, ALBERINI CM. 2010. Limited efficacy of propranolol on the reconsolidation of fear memories. *Learn Mem* 17:306-313.
- MURCHISON CF, SCHUTSKY K, JIN SH, THOMAS SA. 2011. Norepinephrine and β 1-adrenergic signaling facilitate activation of hippocampal CA1 pyramidal neurons during contextual memory retrieval. *Neuroscience* 181:109-116.
- NADEL L, BOHBOT V. 2001. Consolidation of memory. *Hippocampus* 11(1):56-60.

- NADEL L, MOSCOVITCH M. 1997. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 7(2):217-227.
- NADER K, SCHAFFE GE, LEDOUX JE. 2000a. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722-726
- NADER K, SCHAFFE GE, LEDOUX JE. 2000b. The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci* 1(3):216-219.
- NATELSON BH, CREIGHTON D, MCCARTY R, TAPP WN, PITMAN D, OTTENWELLER JE. 1987. Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats. *Physiol Behav* 39(1):117-125.
- NESTLER EJ, HYMAN SE. 2010. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 13(10):1161-1169.
- NEUMEISTER A, SEIDEL J, RAGEN BJ, PIETRZAK RH. 2015. Translational evidence for a role of endocannabinoids in the etiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 51:577-584.
- NEVES G, COOKE SF, BLISS TV. 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9(1):65-75.
- NICHOLAS AP, HÖKFELT T, PIERIBONE VA. 1996. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol Sci* 17:245-255.
- NICHOLAS AP, PIERIBONE VA, HÖKFELT T. 1993. Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 56(4):1023-1039.
- NORRHOLM SD, JOVANOVIĆ T, BRISCIONE MA, ANDERSON KM, KWON CK, WARREN VT, BOSSHARDT L, BRADLEY B. 2014. Generalization of fear-potentiated startle in the presence of auditory cues: a parametric analysis. *Front Behav Neurosci* 8:361.
- O'KEEFE J, NADEL L. 1978. *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Oxford University Press.
- O'CARROLL RE, DRYSDALE E, CAHILL L, SHAJAHAN P, EBMEIER KP. 1999a. Memory for emotional material: a comparison of central versus peripheral beta blockade. *J Psychopharmacol* 13(1):32-39.
- O'CARROLL RE, DRYSDALE E, CAHILL L, SHAJAHAN P, EBMEIER KP. 1999b. Stimulation of the noradrenergic system enhances and blockade reduces memory for emotional material in man. *Psychol Med* 29(5):1083-1088.
- O'DELL TJ, CONNOR SA, GELINAS JN, NGUYEN PV. 2010. Viagra for your synapses: Enhancement of hippocampal long-term potentiation by activation of beta-adrenergic receptors. *Cell Signal* 22(5):728-736.
- O'DELL TJ, HUANG PL, DAWSON TM, DINERMAN JL, SNYDER SH, KANDEL ER, FISHMAN MC. 1994. Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science* 265(5171):542-546.

- O'DONNELL T, HEGADOREN KM, COUPLAND NC. 2004. Noradrenergic mechanisms in the pathophysiology of post-traumatic stress disorder. *Neuropsychobiology* 50:273-283.
- OLSON VG, ROCKETT HR, REH RK, REDILA VA, TRAN PM, VENKOV HA, DEFINO MC, HAGUE C, PESKIND ER, SZOT P, RASKIND MA. 2011. The role of norepinephrine in differential response to stress in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 70:441-448.
- OOSTHUIZEN F, WEGENER G, HARVEY BH. 2005. Nitric oxide as inflammatory mediator in post-traumatic stress disorder (PTSD): evidence from an animal model. *Neuropsychiatr Dis Treat* 1(2):109-123.
- ORSINI CA, MAREN S. 2012. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neurosci Biobehav Rev* 36(7):1773-1802.
- OTA KT, MONSEY MS, WU MS, YOUNG GJ, SCHAFFE GE. 2010. Synaptic plasticity and NO-cGMP-PKG signaling coordinately regulate ERK-driven gene expression in the lateral amygdala and in the auditory thalamus following Pavlovian fear conditioning. *Learn Mem* 17(4):221-235.
- OTA KT, PIERRE VJ, PLOSKI JE, QUEEN K, SCHAFFE GE. 2008. The NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdala via activation of ERK/MAP kinase. *Learn Mem* 15(10):792-805.
- OUYANG M, YOUNG MB, LESTINI MM, SCHUTSKY K, THOMAS SA. 2012. Redundant catecholamine signaling consolidates fear memory via phospholipase C. *J Neurosci* 32(6):1932-1941.
- OVEREEM KA, KOKKINIDIS L. 2012. Nitric oxide synthesis in the basolateral complex of the amygdala is required for the consolidation and expression of fear potentiated startle but not shock sensitization of the acoustic startle. *Neurobiol Learn Mem* 97(1):97-104.
- OVEREEM KA, OTA KT, MONSEY MS, PLOSKI JE, SCHAFFE GE. 2010. A role for nitric oxide-driven retrograde signaling in the consolidation of a fear memory. *Front Behav Neurosci* 4:2.
- PALFAI T, CORNELL JM. 1968. Effect of drugs on consolidation of classically conditioned fear. *J Comp Physiol Psychol* 66(3):584-589.
- PALL ML. 2001. Common etiology of posttraumatic stress disorder, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and multiple chemical sensitivity via elevated nitric oxide/peroxynitrite. *Med Hypotheses* 57(2):139-145.
- PARÉ D. 2002. Mechanisms of Pavlovian fear conditioning: has the engram been located? *Trends Neurosci* 25(9):436-438.
- PARSONS RG, RESSLER KJ. 2013. Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. *Nat Neurosci* 16:146-153.
- PAULUS EJ, ARGO TR, EGGE JA. 2013. The impact of posttraumatic stress disorder on blood pressure and heart rate in a veteran population. *J Trauma Stress* 26(1):169-172.
- PAVESI E, CANTERAS NS, CAROBREZ AP. 2011. Acquisition of Pavlovian fear conditioning using β -adrenoceptor activation of the dorsal preammygdala.

- nucleus as an unconditioned stimulus to mimic live predator-threat exposure. *Neuropsychopharmacology* 36(5):926-939.
- PAVESI E, HELDT SA, FLETCHER ML. 2013. Neuronal nitric-oxide synthase deficiency impairs the long-term memory of olfactory fear learning and increases odor generalization. *Learn Mem* 20(9):482-490.
- PAVLOV IP. 1927. *Conditioned reflexes*. London: Oxford University Press.
- PAXINOS G, WATSON C. 2009. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, Academic Press.
- PAZ R, PARÉ D. 2013. Physiological basis for emotional modulation of memory circuits by the amygdala. *Curr Opin Neurobiol* 23(3):381-386.
- PERRY BD, GILLER EL Jr, SOUTHWICK SM. 1987. Altered platelet α 2-adrenergic binding sites in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 144:1511-1512.
- PITMAN R, SANDERS K, ZUSMAN R, HEALY A, CHEEMA F, LASKO N. 2002. Pilot study of secondary prevention of posttraumatic stress disorder with propranolol. *Biol Psychiatry* 51:189-192.
- PITMAN RK, RASMUSSEN AM, KOENEN KC, SHIN LM, ORR SP, GILBERTSON MW, MILAD MR, LIBERZON I. 2012. Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nat Rev Neurosci* 13:769-787.
- PITMAN RK. 1989. Post-traumatic stress disorder, hormones, and memory. *Biol Psychiatry* 26:221-223.
- PITMAN RK. 2011. Will reconsolidation blockade offer a novel treatment for posttraumatic stress disorder? *Front Behav Neurosci* 5:11.
- PLATH N, OHANA O, DAMMERMANN B, ERRINGTON ML, SCHMITZ D, GROSS C, MAO X, ENGELSBERG A, MAHLKE C, WELZL H, KOBALZ U, STAWRAKAKIS A, FERNANDEZ E, WALTEREIT R, BICK-SANDER A, THERSTAPPEN E, COOKE SF, BLANQUET V, WURST W, SALMEN B, BÖSL MR, LIPP HP, GRANT SG, BLISS TV, WOLFER DP, KUHL D. 2006. Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52(3):437-444.
- PLATH N, OHANA O, DAMMERMANN B, ERRINGTON ML, SCHMITZ D, GROSS C, MAO X, ENGELSBERG A, MAHLKE C, WELZL H, KOBALZ U, STAWRAKAKIS A, FERNANDEZ E, *et al.* 2006. Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52(3):437-444.
- PLOSKI JE, PIERRE VJ, SMUCNY J, PARK K, MONSEY MS, OVEREEM KA, SCHAFE GE. 2008. The activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc/Arg3.1) is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning in the lateral amygdala. *J Neurosci* 28(47):12383-12395.
- POWERS MB, SMITS JA, OTTO MW, SANDERS C, EMMELKAMP PM. 2009. Facilitation of fear extinction in phobic participants with a novel cognitive enhancer: a randomized placebo controlled trial of yohimbine augmentation. *J Anxiety Disord* 23(3):350-356.
- PRICKAERTS J, SIK A, VAN STAVEREN WC, KOOPMANS G, STEINBUSCH HW, VAN DER STAAY FJ, DE VENDE J, BLOKLAND A.

2004. Phosphodiesterase type 5 inhibition improves early memory consolidation of object information. *Neurochem Int* 45(6):915-928.
- PRZYBYSLAWSKI J, ROULLET P, SARA SJ. 1999. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci* 19:6623-6628.
- PRZYBYSLAWSKI J, SARA SJ. 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 84(1-2):241-246.
- PUPO AS, MINNEMAN KP. 2002. Interaction of neuronal nitric oxide synthase with alpha1-adrenergic receptor subtypes in transfected HEK-293 cells. *BMC Pharmacol* 2:17.
- PUSSINEN R, SIRVIÖ J. 1998. Minor role for alpha1-adrenoceptors in the facilitation of induction and early maintenance of long-term potentiation in the CA1 field of the hippocampus. *J Neurosci Res* 51:309-315.
- PUUMALA T, GREIJUS S, NARINEN K, HAAPALINNA A, RIEKKINEN P SR, SIRVIÖ J. 1998. Stimulation of alpha-1 adrenergic receptors facilitates spatial learning in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 8:17-26.
- PUZZO D, SAPIENZA S, ARANCIO O, PALMERI A. 2008. Role of phosphodiesterase 5 in synaptic plasticity and memory. *Neuropsychiatr Dis Treat* 4(2):371-387.
- QIAN H, MATT L, ZHANG M, NGUYEN M, PATRIARCHI T, KOVAL OM, ANDERSON ME, HE K, LEE HK, HELL JW. 2012. β 2-Adrenergic receptor supports prolonged theta tetanus-induced LTP. *J Neurophysiol* 107(10):2703-2712.
- QU LL, GUO NN, LI BM. 2008. Beta1- and beta2-adrenoceptors in basolateral nucleus of amygdala and their roles in consolidation of fear memory in rats. *Hippocampus* 18(11):1131-1139.
- QUIRK GJ, MUELLER D. 2008. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33:56-72.
- RADLEY JJ, WILLIAMS B, SAWCHENKO PE. 2008. Noradrenergic innervation of the dorsal medial prefrontal cortex modulates hypothalamo-pituitary-adrenal responses to acute emotional stress. *J Neurosci* 28(22):5806-5816.
- RAINBOW TC, BIEGON A. 1983. Quantitative autoradiography of [3H]prazosin binding sites in rat forebrain. *Neurosci Lett* 40:221-226.
- RAINBOW TC, PARSONS B, WOLFE BB. 1984. Quantitative autoradiography of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(5):1585-1589.
- RAMOS BP, COLGAN LA, NOU E, ARNSTEN AF. 2008. Beta2 adrenergic agonist, clenbuterol, enhances working memory performance in aging animals. *Neurobiol Aging* 29(7):1060-1069.
- RANDT CT, QUARTERMAIN D, GOLDSTEIN M, ANAGNOSTE B. 1971. Norepinephrine biosynthesis inhibition: effects on memory in mice. *Science* 172(3982):498-499.
- RASCH B, SPALEK K, BUHOLZER S, LUECHINGER R, BOESIGER P, PAPASSOTIROPOULOS A, DE QUERVAIN DJ. 2009. A genetic variation

- of the noradrenergic system is related to differential amygdala activation during encoding of emotional memories. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(45):19191-19196.
- RASKIND MA, DOBIE DJ, KANTER ED, PETRIE EC, THOMPSON CE, PESKIND ER. 2000. The alpha1-adrenergic antagonist prazosin ameliorates combat trauma nightmares in veterans with posttraumatic stress disorder: a report of 4 cases. *J Clin Psychiatry* 61(2):129-133.
- RASKIND MA. 2009. Pharmacologic Treatment of PTSD. In: SHIROMANI PJ, KEANE TM, LEDOUX JE (Eds.). *Post-Traumatic Stress Disorder: Basic Science and Clinical Practice*. New York: Humana Press.
- RASMUSSEN K, JACOBS BL. 1986. Single unit activity of locus coeruleus neurons in the freely moving cat. II. Conditioning and pharmacologic studies. *Brain Res* 371(2):335-344.
- REDONDO RL, MORRIS RG. 2011. Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nat Rev Neurosci* 12(1):17-30.
- REISBERG D, HEUER F. 2004. Memory for emotional events. In: REISBERG D, HERTEL P (Eds). *Memory and emotion*. New York: Oxford University Press.
- RIBOT T. 1882. *Diseases of memory*. New York: Appleton.
- RICHARDSON R, LEDGERWOOD L, CRANNEY J. 2004. Facilitation of fear extinction by D-cycloserine: theoretical and clinical implications. *Learn Mem* 11(5):510-516.
- ROBINSON MJ, ARMSON M, FRANKLIN KB. 2011. The effect of propranolol and midazolam on the reconsolidation of a morphine place preference in chronically treated rats. *Front Behav Neurosci* 5:42.
- ROBINSON MJ, FRANKLIN KB. 2007. Central but not peripheral beta-adrenergic antagonism blocks reconsolidation for a morphine place preference. *Behav Brain Res* 182(1):129-134.
- RODRIGUES H, FIGUEIRA I, LOPES A, GONÇALVES R, MENDLOWICZ MV, COUTINHO ES, VENTURA P. 2014. Does D-cycloserine enhance exposure therapy for anxiety disorders in humans? A meta-analysis. *PLoS One* 9(7):e93519.
- RODRIGUES SM, LEDOUX JE, SAPOLSKY RM. 2009. The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annu Rev Neurosci* 32:289-313.
- RODRIGUEZ M, CARILLON C, COQUEREL A, LE FUR G, FERRARA P, CAPUT D, SHIRE D. 1995. Evidence for the presence of beta 3-adrenergic receptor mRNA in the human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 29:369-375.
- ROOZENDAAL B, BARSEGYAN A, LEE S. 2008. Adrenal stress hormones, amygdala activation, and memory for emotionally arousing experiences. *Prog Brain Res* 167:79-97.
- ROSEN CS, GREENBAUM MA, SCHNURR PP, HOLMES TH, BRENNAN PL, FRIEDMAN MJ. 2013. Do benzodiazepines reduce the effectiveness of exposure therapy for posttraumatic stress disorder? *J Clin Psychiatry* 74(12):1241-1248.

- ROSEN JB, SCHULKIN J. 1998. From normal fear to pathological anxiety. *Psychol Rev* 105(2):325-350.
- ROTHBAUM BO, PRICE M, JOVANOVIĆ T, NORRHOLM SD, GERARDI M, DUNLOP B, DAVIS M, BRADLEY B, DUNCAN EJ, RIZZO A, RESSLER KJ. 2014. A randomized, double-blind evaluation of D-cycloserine or alprazolam combined with virtual reality exposure therapy for posttraumatic stress disorder in Iraq and Afghanistan War veterans. *Am J Psychiatry* 171(6):640-648.
- ROULLET P, SARA S. 1998. Consolidation of memory after its reactivation: involvement of beta noradrenergic receptors in the late phase. *Neural Plast* 6:63-68.
- SAAVEDRA A, GIRALT A, ARUMÍ H, ALBERCH J, PÉREZ-NAVARRO E. 2013. Regulation of hippocampal cGMP levels as a candidate to treat cognitive deficits in Huntington's disease. *PLoS One* 8(9):e73664.
- SALVIATI M, PALLAGROSI M, VALERIANI G, CARLONE C, TODINI L, BIONDI M. 2013. On the role of noradrenergic system in PTSD and related sleep disturbances. The use of terazosin in PTSD related nightmares: a case report. *Clin Ter* 164(2):133-137.
- SANDERS MJ, WILTGEN BJ, FANSELOW MS. 2003. The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur J Pharmacol* 463(1-3):217-223.
- SANDERSON TM, SHER E. 2013. The role of phosphodiesterases in hippocampal synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 74:86-95.
- SANTINI CO, FASSINI A, SCOPINHO AA, BUSNARDO C, CORRÊA FM, RESSTEL LB. 2013. The ventral hippocampus NMDA receptor/nitric oxide/guanylate cyclase pathway modulates cardiovascular responses in rats. *Auton Neurosci* 177(2):244-252.
- SARA SJ, BOURET S. 2012. Orienting and reorienting: the locus coeruleus mediates cognition through arousal. *Neuron* 76(1):130-141.
- SARA SJ, ROULLET P, PRZYBYSLAWSKI J. 1999. Consolidation of memory for odor-reward association: beta-adrenergic receptor involvement in the late phase. *Learn Mem* 6:88-96.
- SARA SJ. 2000. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7:73-84.
- SARA SJ. 2009. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci* 10:211-223.
- SAUERHÖFER E, PAMPLONA FA, BEDENK B, MOLL GH, DAWIRS RR, VON HÖRSTEN S, WOTJAK CT, GOLUB Y. 2012. Generalization of contextual fear depends on associative rather than non-associative memory components. *Behav Brain Res* 233(2):483-493.
- SAUVAGE MM, NAKAMURA NH, BEER Z. 2013. Mapping memory function in the medial temporal lobe with the immediate-early gene Arc. *Behav Brain Res* 254:22-33.
- SCHAFE GE, BAUER EP, ROSIS S, FARB CR, RODRIGUES SM, LEDOUX JE. 2005. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. *Eur J Neurosci* 22(1):201-211.

- SCHILLER D, MONFILS MH, RAI0 CM, JOHNSON DC, LEDOUX JE, PHELPS EA. 2010. Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature* 463(7277):49-53.
- SCHNEIDER AM, SHERMAN W. 1968. Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. *Science* 159(3811):219-221.
- SCHUTSKY K, OUYANG M, CASTELINO CB, ZHANG L, THOMAS SA. 2011. Stress and glucocorticoids impair memory retrieval via β 2-adrenergic, Gi/o-coupled suppression of cAMP signaling. *J Neurosci* 31(40):14172-14181.
- SCHUTSKY K, OUYANG M, THOMAS SA. 2011. Xamoterol impairs hippocampus-dependent emotional memory retrieval via Gi/o-coupled β 2-adrenergic signaling. *Learn Mem* 18:598-604.
- SCHWABE L, NADER K, PRUESSNER JC. 2013. β -Adrenergic blockade during reactivation reduces the subjective feeling of remembering associated with emotional episodic memories. *Biol Psychol* 92(2):227-232.
- SCHWABE L, NADER K, PRUESSNER JC. 2014. Reconsolidation of human memory: brain mechanisms and clinical relevance. *Biol Psychiatry* 76(4):274-280.
- SCHWABE L, NADER K, WOLF OT, BEAUDRY T, PRUESSNER JC. 2012. Neural signature of reconsolidation impairments by propranolol in humans. *Biol Psychiatry* 71:380-386.
- SCOPINHO AA, AGUIAR DC, RESSTEL LB, GUIMARÃES FS, CORRÊA FM. 2012. Brain pathways involved in the modulatory effects of noradrenaline in lateral septal area on cardiovascular responses. *Cell Mol Neurobiol* 32(7):1147-1157.
- SERRES F, RODRIGUEZ M, RIVET JM, GALIZZI JP, LOCKHART B, SHARP T, MILLAN MJ. 2012. Blockade of α 2-adrenoceptors induces Arc gene expression in rat brain in a glutamate receptor-dependent manner: a combined qPCR, in situ hybridisation and immunocytochemistry study. *Neuropharmacology* 63(6):992-1001.
- SHALEV AY, SAHAR T, FREEDMAN S, PERI T, GLICK N, BRANDES D, ORR SP, PITMAN RK. 1998. A prospective study of heart rate response following trauma and the subsequent development of posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 55:553-559.
- SHEN F, LI YJ, SHOU XJ, CUI CL. 2012a. Role of the NO/sGC/PKG signaling pathway of hippocampal CA1 in morphine-induced reward memory. *Neurobiol Learn Mem* 98(2):130-138.
- SHEN F, WANG N, QI C, LI YJ, CUI CL. 2014. The NO/sGC/PKG signaling pathway in the NAc shell is necessary for the acquisition of morphine-induced place preference. *Behav Neurosci* 128(4):446-459.
- SHEN H, FUCHINO Y, MIYAMOTO D, NOMURA H, MATSUKI N. 2012b. Vagus nerve stimulation enhances perforant path-CA3 synaptic transmission via the activation of β -adrenergic receptors and the locus coeruleus. *Int J Neuropsychopharmacol* 15(4):523-530.

- SHEPHERD JD, BEAR MF. 2011. New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 14(3):279-284.
- SIEGMUND A, WOTJAK CT. 2006. Toward an animal model of posttraumatic stress disorder. *Ann NY Acad Sci* 1071:324-334.
- SMITS JA, ROSENFELD D, DAVIS ML, JULIAN K, HANDELSMAN PR, OTTO MW, TUEK P, SHIEKH M, ROSENFELD B, HOFMANN SG, POWERS MB. 2014. Yohimbine enhancement of exposure therapy for social anxiety disorder: a randomized controlled trial. *Biol Psychiatry* 75(11):840-846.
- SMITS JA, ROSENFELD D, OTTO MW, MARQUES L, DAVIS ML, MEURET AE, SIMON NM, POLLACK MH, HOFMANN SG. 2013. D-cycloserine enhancement of exposure therapy for social anxiety disorder depends on the success of exposure sessions. *J Psychiatr Res* 47(10):1455-1461.
- SOETER M, KINDT M. 2011. Disrupting reconsolidation: pharmacological and behavioral manipulations. *Learn Mem* 18:357-366.
- SOETER M, KINDT M. 2012. Stimulation of the noradrenergic system during memory formation impairs extinction learning but not the disruption of reconsolidation. *Neuropsychopharmacology* 37:1204-1215.
- SOETER M, KINDT M. 2013. High trait anxiety: a challenge for disrupting fear memory reconsolidation. *PLoS One* 8:e75239.
- SOUTHWICK SM, BREMNER JD, RASMUSSEN A, MORGAN CA 3rd, ARNSTEN A, CHARNEY DS. 1999. Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 46(9):1192-1204.
- SOUTHWICK SM, KRISTAL JH, MORGAN CA, JOHNSON D, NAGY LM, NICOLAOU A, HENINGER GR, CHARNEY DS. 1993. Abnormal noradrenergic function in posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 50(4):266-274.
- SPRING JD, WOOD NE, MUELLER-PFEIFFER C, MILAD MR, PITMAN RK, ORR SP. 2014. Prereactivation propranolol fails to reduce skin conductance reactivity to prepared fear-conditioned stimuli. *Psychophysiology* 52(3):407-415.
- STARKE K. 2001. Presynaptic autoreceptors in the third decade: focus on alpha2-adrenoceptors. *J Neurochem* 78(4):685-693.
- STECKLER T, RISBROUGH V. 2012. Pharmacological treatment of PTSD - established and new approaches. *Neuropharmacology* 62(2):617-627.
- STEIN MB, KERRIDGE C, DIMSDALE JE, HOYT DB. 2007. Pharmacotherapy to prevent PTSD: Results from a randomized controlled proof-of-concept trial in physically injured patients. *J Trauma Stress* 20:923-932.
- STERN CA, GAZARINI L, TAKAHASHI RN, GUIMARÃES FS, BERTOGLIO LJ. 2012. On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: evidence from cannabidiol treatment. *Neuropsychopharmacology* 37:2132-2142.

- STERN CA, GAZARINI L, VANVOSSSEN AC, HAMES MS, BERTOGLIO LJ. 2014. Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. *Learn Mem* 21:753-759.
- STRAUBE T, FREY JU. 2003. Involvement of beta-adrenergic receptors in protein synthesis-dependent late long-term potentiation (LTP) in the dentate gyrus of freely moving rats: the critical role of the LTP induction strength. *Neuroscience* 119(2):473-479.
- STRAWN JR, GERACIOTI TD Jr. 2008. Noradrenergic dysfunction and the psychopharmacology of posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety* 25(3):260-271.
- SUMMERS RJ, PAPAIOANNOU M, HARRIS S, EVANS BA. 1995. Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat brain. *Br J Pharmacol* 116:2547-2548.
- SUZUKI A, MUKAWA T, TSUKAGOSHI A, FRANKLAND PW, KIDA S. 2008. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learn Mem* 15(6):426-433.
- SVED AF, CANO G, PASSERIN AM, RABIN BS. 2002. The locus coeruleus, Barrington's nucleus, and neural circuits of stress. *Physiol Behav* 77(4-5):737-742.
- TAHERIAN F, VAFAEI AA, VAEZI GH, ESKANDARIAN S, KASHEF A, RASHIDY-POUR A. 2014. Propranolol-induced Impairment of Contextual Fear Memory Reconsolidation in Rats: A similar Effect on Weak and Strong Recent and Remote Memories. *Basic Clin Neurosci* 5(3):231-239.
- TAMBURELLA A, MICALE V, LEGGIO GM, DRAGO F. 2010. The beta3 adrenoceptor agonist, amibegron (SR58611A) counteracts stress-induced behavioral and neurochemical changes. *Eur Neuropsychopharmacol* 20(10):704-713.
- TANAKA M, KOHNO Y, NAKAGAWA R, IDA Y, TAKEDA S, NAGASAKI N. 1982. Time-related differences in noradrenaline turnover in rat brain regions by stress. *Pharmacol Biochem Behav* 16:315-319.
- TAUBENFELD SM, MILEKIC MH, MONTI B, ALBERINI CM. 2001. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 4:813-818.
- TOLLENAAR MS, ELZINGA BM, SPINHOVEN P, EVERAERD W. 2009. Psychophysiological responding to emotional memories in healthy young men after cortisol and propranolol administration. *Psychopharmacology* 203(4):793-803.
- TOTH SL, CICCHETTI D. 2011. Frontiers in translational research on trauma. *Dev Psychopathol* 23(2):353-355.
- TRONEL S, FEENSTRA MG, SARA SJ. 2004. Noradrenergic action in prefrontal cortex in the late stage of memory consolidation. *Learn Mem* 11:453-458.
- TRONEL S, SARA SJ. 2002. Mapping of olfactory memory circuits: region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learn Mem* 9(3):105-111.

- TRONSON NC, TAYLOR JR. 2007. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 8(4):262-275.
- TSUDA A, TANAKA M, IDA Y, TSUJIMARU S, NAGASAKI N. 1986. Effects of shock controllability on rat brain noradrenaline turnover under FR-1 and FR-3 Sidman avoidance schedules. *Physiol Behav* 37(6):945-950.
- TYLER WJ, ALONSO M, BRAMHAM CR, POZZO-MILLER LD. 2002. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem* 9(5):224-237.
- TZINGOUNIS AV, NICOLL RA. 2006. Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron* 52(3):403-407.
- TZINGOUNIS AV, VON ZASTROW M, YUDOWSKI GA. 2010. {Beta}-blocker drugs mediate calcium signaling in native central nervous system neurons by {beta}-arrestin-biased agonism. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(49):21028-21033.
- UDAYABANU M, KUMARAN D, NAIR RU, SRINIVAS P, BHAGAT N, ANEJA R, KATYAL A. 2008. Nitric oxide associated with iNOS expression inhibits acetylcholinesterase activity and induces memory impairment during acute hypobaric hypoxia. *Brain Res* 1230:138-149.
- URSINO MG, VASINA V, RASCHI E, CREMA F, DE PONTI F. 2009. The beta3-adrenoceptor as a therapeutic target: current perspectives. *Pharmacol Res* 59(4):221-234.
- UYS JD, STEIN DJ, DANIELS WM, HARVEY BH. 2003. Animal models of anxiety disorders. *Curr Psychiatry Rep* 5(4):274-281.
- VAIVA G, DUCROCQ F, JEZEQUEL K, AVERLAND B, LESTAVEL P, BRUNET A, MARMAR CR. 2003. Immediate treatment with propranolol decreases posttraumatic stress disorder two months after trauma. *Biol Psychiatry* 54:947-949.
- VAN DE KAR LD, BLAIR ML. 1999. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 20(1):1-48.
- VAN ELZAKKER MB, DAHLGREN MK, DAVIS FC, DUBOIS S, SHIN LM. 2014. From Pavlov to PTSD: the extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. *Neurobiol Learn Mem* 113:3-18.
- VAN STEGEREN AH, EVERAERD W, CAHILL L, MCGAUGH JL, GOOREN LJ. 1998. Memory for emotional events: differential effects of centrally versus peripherally acting beta-blocking agents. *Psychopharmacology* 138(3-4):305-310.
- VAN STEGEREN AH, EVERAERD W, GOOREN LJ. 2002. The effect of beta-adrenergic blockade after encoding on memory of an emotional event. *Psychopharmacology* 163(2):202-212.
- VAN STEGEREN AH. 2008. The role of the noradrenergic system in emotional memory. *Acta Psychol* 127:532-541.
- VAN VELDHUIZEN MJ, FEENSTRA MG, BOER GJ. 1994. Regional differences in the in vivo regulation of the extracellular levels of noradrenaline and its metabolites in rat brain. *Brain Res* 635:238-248.

- VANIOTIS G, GLAZKOVA I, MERLEN C, SMITH C, VILLENEUVE LR, CHATENET D, THERIEN M, FOURNIER A, TADEVOSYAN A, TRIEU P, NATTEL S, HÉBERT TE, ALLEN BG. 2013. Regulation of cardiac nitric oxide signaling by nuclear β -adrenergic and endothelin receptors. *J Mol Cell Cardiol* 62:58-68.
- VERTES RP. 2006. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142(1):1-20.
- VERVLIET B. 2008. Learning and memory in conditioned fear extinction: effects of D-cycloserine. *Acta Psychol* 127(3):601-613.
- VETERE G, PISERCHIA V, BORRECA A, NOVEMBRE G, ACETI M, AMMASSARI-TEULE M. 2013. Reactivating fear memory under propranolol resets pre-trauma levels of dendritic spines in basolateral amygdala but not dorsal hippocampus neurons. *Front Behav Neurosci* 7:211.
- VIOLA H, BALLARINI F, MARTÍNEZ MC, MONCADA D. 2014. The tagging and capture hypothesis from synapse to memory. *Prog Mol Biol Transl Sci* 122:391-423.
- VIOLLE N, BALANDRAS F, LE ROUX Y, DESOR D, SCHROEDER H. 2009. Variations in illumination, closed wall transparency and/or extramaze space influence both baseline anxiety and response to diazepam in the rat elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 203(1):35-42.
- VOLIANSKIS A, FRANCE G, JENSEN MS, BORTOLOOTTO ZA, JANE DE, COLLINGRIDGE GL. 2015. Long-term potentiation and the role of N-methyl-d-aspartate receptors. *Brain Res* [No prelo].
- VON HERTZEN LS, GIESE KP. 2005. Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *J Neurosci* 25(8):1935-1942.
- WANG QW, ROWAN MJ, ANWYL R. 2009. Inhibition of LTP by beta-amyloid is prevented by activation of beta2 adrenoceptors and stimulation of the cAMP/PKA signalling pathway. *Neurobiol Aging* 30(10):1608-1613.
- WENDLAND B, SCHWEIZER FE, RYAN TA, NAKANE M, MURAD F, SCHELLER RH, TSIEN RW. 1994. Existence of nitric oxide synthase in rat hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(6):2151-2155.
- WHITLOCK JR, HEYNEN AJ, SHULER MG, BEAR MF. 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313(5790):1093-1097.
- WILTGEN BJ, SILVA AJ. 2007. Memory for context becomes less specific with time. *Learn Mem* 14(4):313-317.
- WÖHR M, BORTA A, SCHWARTING RK. 2005. Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose-response study in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 84(3):228-240.
- WRITER BW, MEYER EG, SCHILLERSTROM JE. 2014. Prazosin for military combat-related PTSD nightmares: a critical review. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 26(1):24-33.

- XU W, SÜDHOF TC. 2013. A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science* 339:1290-1295.
- YEHUDA R, ANTELMAN SM. 1993. Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 33(7):479-486.
- YEHUDA R, JOËLS M, MORRIS RG. 2010. The memory paradox. *Nat Rev Neurosci* 11(12):837-839.
- YEHUDA R, LEDOUX J. 2007. Response variation following trauma: a translational neuroscience approach to understanding PTSD. *Neuron* 56(1):19-32.
- YEHUDA R, MCFARLANE AC, SHALEV AY. 1998. Predicting the development of posttraumatic stress disorder from the acute response to a traumatic event. *Biol Psychiatry* 44:1305-1313.
- YEHUDA R, NEYLAN TC, FLORY JD, MCFARLANE AC. 2013. The use of biomarkers in the military: from theory to practice. *Psychoneuroendocrinology* 38(9):1912-1922.
- ZARRINDAST MR, GHIASVAND M, REZAYOF A, AHMADI S. 2012. The amnesic effect of intra-central amygdala administration of a cannabinoid CB1 receptor agonist, WIN55,212-2, is mediated by a β -1 noradrenergic system in rat. *Neuroscience* 212:77-85.
- ZHANG J, MULLER JF, MCDONALD AJ. 2013. Noradrenergic innervation of pyramidal cells in the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* 228:395-408.
- ZHANG L, OUYANG M, GANELLIN CR, THOMAS SA. 2013. The slow afterhyperpolarization: a target of β 1-adrenergic signaling in hippocampus-dependent memory retrieval. *J Neurosci* 33(11):5006-5016.
- ZHANG WP, GUZOWSKI JF, THOMAS SA. 2005. Mapping neuronal activation and the influence of adrenergic signaling during contextual memory retrieval. *Learn Mem* 12(3):239-247.
- ZHANG WP, OUYANG M, THOMAS SA. 2004. Potency of catecholamines and other L-tyrosine derivatives at the cloned mouse adrenergic receptors. *Neuropharmacology* 47:438-449.
- ZHANG Y, FUKUSHIMA H, KIDA S. 2011. Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Mol Brain* 4:4.
- ZHANG Z, DING L, JIN Z, GAO G, LI H, ZHANG L, ZHANG L, LU X, HU L, LU B, YU X, HU T. 2014. Nebivolol protects against myocardial infarction injury via stimulation of beta 3-adrenergic receptors and nitric oxide signaling. *PLoS One* 9(5):e98179.
- ZHENG H, RINAMAN L. 2013. Yohimbine anxiogenesis in the elevated plus maze requires hindbrain noradrenergic neurons that target the anterior ventrolateral bed nucleus of the stria terminalis. *Eur J Neurosci* 37(8):1340-1349.
- ZHIHUI Q. 2013. Modulating nitric oxide signaling in the CNS for Alzheimer's disease therapy. *Future Med Chem* 5(12):1451-1468.
- ZHOU HC, SUN YY, CAI W, HE XT, YI F, LI BM, ZHANG XH. 2013. Activation of β 2-adrenoceptor enhances synaptic potentiation and behavioral

- memory via cAMP-PKA signaling in the medial prefrontal cortex of rats. *Learn Mem* 20(5):274-284.
- ZINN CG, BEVILAQUA LR, ROSSATO JI, MEDINA JH, IZQUIERDO I, CAMMAROTA M. 2009. On the requirement of nitric oxide signaling in the amygdala for consolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiol Learn Mem* 91(3):266-272.
- ZOLADZ PR, DIAMOND DM. 2013. Current status on behavioral and biological markers of PTSD: a search for clarity in a conflicting literature. *Neurosci Biobehav Rev* 37:860-895.
- ZOLADZ PR, FLESHNER M, DIAMOND DM. 2013. Differential effectiveness of tianeptine, clonidine and amitriptyline in blocking traumatic memory expression, anxiety and hypertension in an animal model of PTSD. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 44:1-16.

6.1 Produção relacionada

- GAZARINI L, STERN CAJ, CAROBREZ AP, BERTOGLIO LJ. 2013. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting α 1- and β -adrenergic receptors. *Learn Mem* 20(4):210-219.
- GAZARINI L, STERN CAJ, PIORNEDO RR, TAKAHASHI RN, BERTOGLIO LJ. 2015. PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. *Int J Neuropsychopharmacol* 18(1) [No prelo] (doi: 10.1093/ijnp/pyu026).
- GAZARINI L, STERN CAJ, VANVOSSSEN AC, BERTOGLIO LJ. β 3-adrenoceptor activation in the dorsal hippocampus induces fear generalization through the recruitment of NO pathway. [Em preparação].

