

FERNANDA NAVARRO MARIN

**EFEITO DE INTERVENÇÕES FARMACOLÓGICAS ANTES
E/OU APÓS A EXPRESSÃO GENERALIZADA DE MEDO SOBRE
A MEMÓRIA AVERSIVA ORIGINAL EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia, pelo Programa de Pós Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Orientador: Prof. Dr. Leandro José Bertoglio. Coorientador: Dr. Marcelo Giachero.

**Florianópolis
2017**

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

MARIN, FERNANDA NAVARRO

EFEITO DE INTERVENÇÕES FARMACOLÓGICAS ANTES E/OU APÓS A EXPRESSÃO GENERALIZADA DE MEDO SOBRE A MEMÓRIA AVERSIVA ORIGINAL EM RATOS / FERNANDA NAVARRO MARIN ; orientador, LEANDRO JOSÉ BERTOGLIO ; coorientador, MARCELO GIACHERO. - Florianópolis, SC, 2017.

109 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

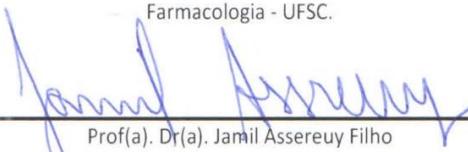
1. Farmacologia. 2. Generalização do medo. 3. Modulação farmacológica. 4. Memória aversiva. 5. Condicionamento aversivo. I. BERTOGLIO, LEANDRO JOSÉ. II. GIACHERO, MARCELO. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

“Efeito de intervenções farmacológicas antes e/ou após a expressão generalizada de medo sobre a memória aversiva original em ratos”

Por

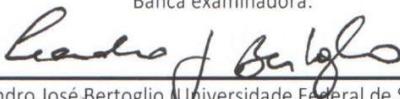
Fernanda Navarro Marin

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (03/PPGFMC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Jamil Assereuy Filho
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

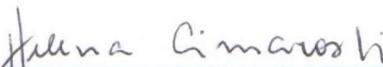
Banca examinadora:



Dr(a) Leandro José Bertoglio (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Lucas Gazarini (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul)



Dr(a) Helena Iturvides Cimarosti (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Eloisa Pavesi (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 27 de janeiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por abençoar toda a minha jornada.

À minha família João, Maria, Mariana e Robson, pelo amor, suporte psicológico, pela paciência, apoio e por acreditar em mim.

Ao meu namorado e companheiro Ricardo pelo meu riso garantido, pela paciência, pelo carinho e cumplicidade, por estar sempre comigo, por me encorajar e nunca me deixar desanimar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leandro José Bertoglio, pela oportunidade e por me acolher no grupo do laboratório, dividindo sua experiência e ensinamentos.

Ao meu coorientador Dr. Marcelo Giachero, pela paciência, pelas horas de discussão e por sempre provocar minha curiosidade.

Ao nosso grupo de laboratório, nossa equipe: Rafael, Fernanda Troyner, Bárbara, Hugo, Rebecca, Felipe, que de muitas formas tornaram os dias mais agradáveis e o trabalho melhor, além de ajudar na construção do aprendizado.

À Marina e à Ana por me ensinarem muito, mas principalmente, por dividirem sua rotina e seus sorrisos comigo, por darem tanta cor aos meus dias! Por tornarem tão valiosa minha estadia em Florianópolis, por se tornarem minhas grandes amigas!

À Aline e à Karina, minha família de Floripa, por tornarem meus dias leves e divertidos, pelas horas de conversas regadas a pipoca! Minhas novas e amadas irmãs!

À Camila, meu Tíbio, minha primeira parceira de laboratório, com quem dividi as primeiras dificuldades, mas também com quem aprendi a amar a ciência! Minha grande amiga, o melhor presente que Universidade me deu.

Aos meus amigos sensacionais, pelas minhas horas mais divertidas e a companhia deliciosa. Pela amizade e proximidade mesmo com a

distância! Que continuemos “tentando dominar o mundo” por muito tempo.

Á todos os professores e aos funcionários do Departamento de Farmacologia que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Aos animais experimentais, veículos indispensáveis ao aprimoramento da ciência, fica aqui registrado minha gratidão, respeito e reconhecimento.

Ao CNPq, à CAPES e à UFSC pelo suporte, essencial para a realização deste trabalho..

“...
É saber se sentir infinito
Num universo tão vasto e bonito
É saber sonhar
E então fazer valer a pena cada verso
Daquele poema sobre acreditar

Não é sobre chegar ao topo do mundo
Saber que venceu
É sobre escalar e sentir
Que o caminho te fortaleceu
...”

Música “Trem – Bala”
(Ana Vilela)

RESUMO

A generalização do medo é descrita como a tendência de um estímulo não-associado ao evento aversivo original gerar uma resposta condicionada. Para memórias aversivas é comum haver certo grau de generalização, ou seja, as respostas defensivas raramente são limitadas a situações ou estímulos relacionados ao evento aversivo, o que, por sua vez, permite aos indivíduos reagir apropriadamente ao ambiente dinâmico a que estão rotineiramente expostos. Assim, a generalização pode ser interpretada como um processo natural e adaptativo do ponto de vista evolutivo. Por outro lado, no caso de alguns transtornos psiquiátricos, por exemplo, a generalização pode resultar na expressão de respostas defensivas inapropriadas, tornando este fenômeno de tamanha importância clínica. Apesar de não se tratar de um tema recente, grande atenção tem se voltado na compreensão de mecanismos envolvidos, os quais destacam a natureza complexa deste fenômeno. O que se especula é que a expressão generalizada de medo se dá pela evocação da memória original em um contexto diferente. Assim, o objetivo do presente estudo foi o de investigar os efeitos de intervenções farmacológicas antes e/ou após a expressão generalizada de medo sobre a resposta de medo condicionada ao contexto pareado. Para este fim, ratos Wistar machos foram submetidos ao protocolo de condicionamento aversivo contextual (contexto A pareado com 3 choques de 0,7 mA) seguido da administração sistêmica de ioimbina (i.p. 2,0 mg/kg - antagonista de receptores α 2-adrenérgicos) para indução da generalização das respostas defensivas. Demonstramos que duas, mas não uma, exposições ao contexto não-pareado (contexto B), seguidas da administração de clonidina (i.p. 0,3 mg/kg - agonista de receptores α 2-adrenérgicos) atenuam a expressão de congelamento no contexto pareado (contexto A) no dia seguinte à última manipulação. A administração de D-cicloserina (i.p. 15 mg/kg – agonista parcial de receptores glutamatérgicos NMDA) previamente a uma única exposição ao contexto não-pareado seguida da administração de clonidina tornou a memória original mais susceptível à ação amnésica da clonidina após a exposição ao contexto pareado. O tratamento prévio com ifenprodil (1 mg/ml – antagonista da sub-unidade GluN₂B do receptor glutamatérgico NMDA) no hipocampo dorsal bloqueou parcialmente os efeitos da clonidina após reativação no contexto pareado, indicando que os efeitos observados estão relacionados, pelo menos em parte, à alteração do perfil de labilização da memória potencializada e que o hipocampo pode ser um sítio de grande interesse para investigações futuras. Juntos, estes dados indicam a possibilidade de atenuar uma

memória aversiva a partir de um contexto não associado ao evento aversivo original, sugerindo que, nesta ocasião a memória pode ser reativada, desestabilizada e até mesmo modulada com o uso de drogas amnésicas.

Palavras-chave: Generalização do medo, Modulação farmacológica, Memória aversiva; Condicionamento aversivo.

ABSTRACT

The fear generalization is described as a tendency of a similar stimulus to the original aversive one in generate conditioned responses. It is common aversive memories have a certain degree of generalization. Defensive responses are rarely limited to situations or stimuli related to the aversive event, which in turn, allow individuals to react appropriately to the dynamic environment where they are routinely exposed. Thus, fear generalization can be interpreted as a natural and adaptive process from the evolutionary point of view. On the other hand, in the case of some psychiatric disorders, for example, the generalization may result in the expression of inappropriate defensive responses, making this phenomenon of such clinical importance. Great focus has been placed on understanding the involved mechanisms, which highlights the complex nature of this phenomenon. The hypothesis of this work is that the expression of generalized fear is related to the retrieval of the original memory in a different context. Consequently, the aim of the present study was to investigate the effect of pharmacological intervention around the exposure to a novel context on the fear response to a familiar one (paired context). To achieve this goal, male Wistar rats were subjected to contextual fear conditioning (context A paired with 3 footshocks of 0.7mA) followed by systemic injection of yohimbine (i.p. 2.0 mg/kg - α 2-adrenoceptor antagonist), which leads to an expression of generalized response of fear. We have shown that two, and not one, exposures to the novel context (context B), followed by administration of clonidine (i.p. 0.3 mg/kg - α 2-adrenoceptor agonist) attenuated freezing expression in the paired context (context A) on the day after the last manipulation. D-cycloserine injection (i.p. 15 mg/kg - a partial agonist of the glutamatergic NMDA receptor) before a single context B exposure followed by systemic administration of clonidine rendered the original memory more susceptible to reconsolidation disruption by clonidine after paired context exposure. The previous administration of ifenprodil (an specific GluN2B-containing NMDA receptor antagonist) in the dorsal hippocampus partially blocked the effects of clonidine after retrieval in the paired context, what indicates that the clonidine effects are in part due to a change in the memory destabilization into hippocampus and it can be a site of great interest for future investigations. Altogether, these results indicate the possibility of attenuating traumatic-like memory after the exposure to a context not associated with the original aversive event, suggesting that, in this situation, memory would be retrieved, destabilized and further impaired by reconsolidation blockers.

Key words: Fear generalization, Pharmacological intervention, Fear memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do processo de consolidação da memória.....p.24

Figura 2 – Representação esquemática dos processos de evocação e labilização de uma memória.p.27

Figura 3 – Representação esquemática do processo de reconsolidação de uma memória.....p.28

Figura 4 – Importância funcional do balanço entre precisão e generalização na dinâmica comportamental em resposta a possíveis ameaças.....p.33

Figura 5 – Condicionamento contextual aversivo e o estudo da generalização do medo.....p.35

Figura 6 – Representação esquemática da abordagem proposta: generalização como estratégia de modulação de memórias aversivas.....p.43

Figura 7 – Representação esquemática dos protocolos de condicionamento de medo contextual utilizados neste trabalho.....p.49

Figura 8 - Análise histológica das microinjeções no hipocampo dorsalp.52

Figura 9 - A administração de ioimbina imediatamente após o condicionamento é capaz de induzir a generalização das respostas de

medo e apresenta papel sobre a persistência da resposta condicionada ao contexto pareado.....p.56

Figura 10 - Influência da evocação e sala de exposição ao teste B na resposta de medo generalizada provocada pela ioimbina.....p.58

Figura 11 - O efeito da ioimbina é específico para a formação da memória aversiva, quando esta é associada ao contexto.....p.60

Figura 12 – A administração de clonidina após expressão da resposta generalizada não altera a expressão de medo no contexto pareado, bem como não a altera no próprio contexto não-pareado.....p.62

Figura 13 - O efeito amnésico da clonidina sobre a memória original é evidente após duas exposições sucessivas ao contexto não-pareado.....p.64

Figura 14 - A facilitação da labilização por administração prévia de D-cicloserina foi mais efetiva em evidenciar o efeito amnésico da clonidina que o aumento do tempo de exposição ao contexto não-pareado.....p.66

Figura 15 – O bloqueio da reconsolidação combinado à facilitação da labilização no contexto não-pareado torna a memória original mais susceptível à intervenção farmacológica, frente à evocação no contexto pareado.....p.68

Figura 16 – O hipocampo parece ser um sítio importante de labilização necessário para os efeitos do bloqueio da reconsolidação da memória generalizada sobre a memória original.....p.70

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Micro litro
ABL	Amídala baso-lateral
AG	Ansiedade generalizada
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
Arc	Proteína associada ao citoesqueleto regulada por ativação, do inglês " <i>activity regulated cytoskeletal protein</i> "
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês " <i>brain-derived neurotrophic factor</i> "
BHE	Barreira hematoencefálica
CLO	Clonidina
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc, do inglês " <i>cAMP response element-binding protein</i> "
DCS	D-cicloserina
EI	Estímulo incondicionado
EM	Estímulo neutro
EPM	Erro padrão da média
GluA₂	Subunidade de receptor AMPA
GluN_{2B}	Subunidade de receptor NMDA
HD	Hipocampo dorsal
HV	Hipocampo ventral
i.p.	Intraperitoneal
IFEN	Ifenprodil
IOI	Ioimbina, antagonista de receptores α ₂ -adrenérgicos
Kg	Quilograma

LC	<i>Locus coeruleus</i>
LTP	Potencialização de longa duração, do inglês " <i>long-term potentiation</i> "
mg	Miligrama
ml	Militro
NMDA	N-metil-D-aspartato
PBS	Tampão fosfato-salina
rCB1	Receptor canabinóide do tipo 1
s.c	Sub-cutânea
TEPT	Transtorno de estresse pós traumático
VEI	Veículo
zif-268/Egr1	Do inglês " <i>zinc finger transcription factor</i> "

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
1.1 MEMÓRIA.....	21
1.1.1 MEMÓRIAS AVERSIVAS: INFLUÊNCIA EMOCIONAL NO PROCESSAMENTO MNEMÔNICO.....	22
1.1.2 ETAPAS DA MEMÓRIA.....	24
1.1.2.1 <i>Consolidando uma memória: do aprendizado ao armazenamento da informação.....</i>	24
1.1.2.2 <i>A memória consolidada não é imutável: Processos de evocação, labilização e reconsolidação da memória.....</i>	26
1.2 GENERALIZAÇÃO DO MEDO.....	31
1.2.1 GENERALIZAÇÃO: IMPORTÂNCIA ADAPTATIVA X COMPONENTE DE MEMÓRIAS AVERSIVAS DISFUNCIONAIS.....	33
1.2.2 ESTUDO DA GENERALIZAÇÃO DO MEDO: PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO AVERSIVO CONTEXTUAL.....	34
1.3 MODULANDO MEMÓRIAS AVERSIVAS.....	37
1.3.1 MODULAÇÃO NORADRENÉRGICA NO PROCESSAMENTO DAS MEMÓRIAS AVERSIVAS.....	38
1.3.1.1 <i>Sistema noradrenérgico na potencialização da memória aversiva: Ioimbina como indutor de generalização.....</i>	39
1.3.1.2 <i>Sistema noradrenérgico e a reconsolidação da memória aversiva: clonidina como droga amnésica.....</i>	40
1.3.2 O DESAFIO A RESPEITO DE MEMÓRIAS “DISFUNCIONAIS”: IMPORTÂNCIA DA LABILIZAÇÃO PARA A EFETIVIDADE DA MODULAÇÃO. ..	40
1.3.3 MODULAÇÃO DA GENERALIZAÇÃO COMO ESTRATÉGIA DE INTERVENÇÃO EM MEMÓRIAS AVERSIVAS.....	42
OBJETIVOS.....	45
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 ANIMAIS.....	47
3.2 DROGAS.....	47

3.3	CONDICIONAMENTO DE MEDO CONTEXTUAL	48
3.3.1	<i>Equipamentos:</i>	48
3.3.2	<i>Protocolos:</i>	48
3.3.3	<i>Manipulações farmacológicas:</i>	49
3.3.4	<i>Considerações gerais:</i>	50
3.4	PROCEDIMENTOS PARA MICRO-INFUSÃO INTRACEREBRAL.....	50
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	53
RESULTADOS		55
SESSÃO 1 DE DADOS – CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA DE MEDO GENERALIZADA..... 55		
	<i>Experimento 1 – Seleção da dose de IOI capaz de provocar generalização das respostas de medo</i>	55
	<i>Experimento 2 - Influência de modificações do protocolo de condicionamento de medo ao contexto na resposta de medo generalizada</i>	57
	<i>Experimento 3 – Investigação da possível ocorrência de sensibilização das respostas defensivas provocada pela estimulação noradrenérgica com ioimbina</i>	59
SESSÃO 2 DE DADOS – UTILIZANDO A RESPOSTA DE MEDO GENERALIZADA COMO FORMA DE INTERVENÇÃO NA MEMÓRIA ORIGINAL..... 61		
	<i>Experimento 4 – Efeito de uma única administração de clonidina após exposição ao contexto não-pareado sobre a expressão de medo no contexto pareado e no contexto não-pareado - embasada no bloqueio de “reconsolidação”</i>	61
	<i>Experimento 5 - Influência da re-exposição ao contexto não-pareado sobre o efeito amnésico da clonidina</i>	63
	<i>Experimento 6 - Efeito da facilitação da labilização sobre a ação da clonidina no contexto não-pareado</i>	65
	<i>Experimento 7 - Efeito de intervenções farmacológicas após a expressão generalizada de medo sobre a resistência da memória aversiva original à ação amnésica da clonidina no contexto pareado</i>	67
	<i>Experimento 8 - Envolvimento do hipocampo como sítio de labilização necessário para a modulação da resposta de medo condicionada, partindo de intervenções farmacológicas após a expressão generalizada de medo</i>	69

DISCUSSÃO	73
5.1 A GENERALIZAÇÃO DE RESPOSTAS DEFENSIVAS POR ESTIMULAÇÃO FARMACOLÓGICA: AS BASES DA PESQUISA	73
5.1.1 <i>O fenômeno da “generalização de medo”</i>	73
5.1.2 <i>Uso da ioimbina como ferramenta farmacológica:</i>	75
5.1.3 <i>Adequações metodológicas</i>	76
5.2 MODULAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA ORIGINAL A PARTIR DA RESPOSTA GENERALIZADA DE MEDO	79
5.2.1 <i>Clonidina e seu efeito amnésico</i>	79
5.2.2 <i>Labilização como mecanismo chave: importância e envolvimento do hipocampo</i>	81
CONCLUSÕES	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DO ESTUDO	87
REFERENCIAS	89

INTRODUÇÃO

1.1 MEMÓRIA

A capacidade de reter informações ao longo do tempo em forma de representações internas é chamada de memória (DUDAI, 2002). Estas representações são codificações a nível neuronal das experiências prévias a que um indivíduo é exposto durante sua vida, sendo capazes de guiar seu comportamento (DUDAI 1989). Desta forma, é possível afirmar que as memórias representam a essência humana, moldando o seu modo de agir e pensar, ou seja, sua personalidade.

“Recordação é um processo cognitivo fundamental que auxilia praticamente todas as outras funções cognitivas importantes... Uma vez que sem memória não se poderia sequer pensar, alguns filósofos vão ainda mais longe com a alegação de que a memória é a marca do ser humano”.

(BERNECKER, 2010).

1.1.1 Memórias aversivas: influência emocional no processamento mnemônico

“Nosso cérebro, notável como ele é, não poderia reter e dar o mesmo valor para cada experiência de nossa vida.”

(GLORE, 1987)

A investigação de processos e sistemas neurobiológicos que contribuem para diferenças na relevância de nossas memórias indica que experiências atreladas à emoção são capazes de ativar sistemas hormonais e cerebrais, os quais regulam a consolidação de experiências recentemente adquiridas (ROOZENDAAL e MCGAUGH, 2011; IZQUIERDO, FURINI, MYSKIW, 2016). Assim, a emoção envolvida em uma determinada situação pode claramente influenciar no armazenamento da memória relacionada a este evento (MCGAUGH, 2013), sendo fundamental para a distinção e processamento das centenas de informações a que somos expostos diariamente (ETKIN, BÜCHEL e GROSS, 2015).

Está demonstrado que experiências emocionalmente relevantes são capazes de gerar memórias robustas e persistentes (ROOZENDAAL, BARSEGYAN, LEE, 2008). Isto garante o armazenamento de informações relevantes, que permitirão identificar, antecipar e evitar possíveis estímulos que ameaçam a integridade do organismo em encontros futuros. Por exemplo, experiências aversivas e a posterior evocação da memória relacionada a tal evento (para revisão ver IZQUIERDO, FURINI, MYSKIW, 2016) geralmente são acompanhadas da expressão de respostas comportamentais e fisiológicas adaptativas relacionadas, tal qual o medo, com base ao que já foi experimentado/presenciado pelo indivíduo (GROSS E CANTERAS, 2012; DYMOND, 2014; LEDOUX e PINE, 2016).

No entanto, em alguns casos, a codificação das memórias aversivas pode tornar-se inadequada (ITZHAK; PEREZ-LANZA; LIDDIE, 2014) e o estresse severo e/ou crônico, pode, muitas vezes, apresentar-se como uma fonte de transtornos afetivos (YEHUDA, JOËLS, MORRIS, 2010; QUERVAIN, SCHWABE E ROOZENDAAL, 2017), tais como ansiedade generalizada, depressão e transtornos relacionados a trauma e estressores, tais como transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) e fobias (*American Psychiatric Association*, 2013).

A maior compreensão dos mecanismos através dos quais a emoção e o estresse influenciam os processos cognitivos pode ter implicações potenciais em termos de prevenção e tratamento, bem como na melhora da qualidade de vida dos pacientes acometidos por tais transtornos (SHIN e LIBERZON, 2010; PARSONS e RESSLER, 2013; AGREN, 2014), justificando o interesse no modelamento pré-clínico de memórias traumáticas muito intensas e de difícil intervenção.

1.1.2 Etapas da memória

1.1.2.1 Consolidando uma memória: do aprendizado ao armazenamento da informação

O aprendizado refere-se à aquisição de uma nova informação, com base nas experiências vivenciadas pelo indivíduo (DUDAI, 2002). Essas novas informações são convertidas em um traço de memória, em um processo referido como codificação ou “*encoding*” da memória (DUDAI, 2002). A partir daí, em uma janela de tempo estabelecida (IZQUIERDO et al., 1999), este traço de memória é estabilizado gradualmente (DAVIS e SQUIRE, 1984; GOELET et al., 1986; MCGAUGH, 2000; WIXTED e CAI, 2013) – processo conhecido hoje como **consolidação** (Figura 1).



Figura 1 – Representação esquemática do processo de consolidação da memória. Após a aquisição de uma informação, o traço de memória é estabilizado gradualmente e torna-se permanente através da consolidação. Já se sabe que este processo é dependente de modificações sinápticas nos circuitos neurais (adaptado de GAZARINI, 2015).

A teoria da consolidação foi primeiramente proposta por Müller e Pilzecker, em 1900, em seu trabalho “Contribuições Experimentais para a Teoria da Lembrança”, no qual demonstraram em humanos, que a memória de uma informação recentemente aprendida poderia ser interrompida pela aquisição de outro tipo de informação logo após o aprendizado inicial (MULLER e PILZECKER 1900; LECHNER, SQUIRE E BYRNE, 1999). Estes achados trouxeram à tona a dinâmica temporal de formação das memórias, demonstrando que as mesmas não

se estabelecem instantaneamente (DUDAI, 2004), e sim, que são necessários processos subjacentes para a estabilização gradual da informação após sua aquisição, período no qual a memória ainda está susceptível à ação de interferentes (MÜLLER; PILZECKER, 1900; SARA 2008; SQUIRE et al., 2015). Ignorada por quase meio século, a teoria da consolidação foi retomada em 1949, quando duas publicações relataram que o choque eletroconvulsivo após o aprendizado era capaz de induzir experimentalmente amnésia retrógrada em roedores (DUNCAN, 1949; GERARD, 1949), o que levou, posteriormente, a uma série de estudos a cerca deste tema (GLICKMAN, 1961; MCGAUGH, 1966).

Uma explicação fisiológica para o conceito de consolidação proposto previamente por Müller e Pilzecker foi fornecida no mesmo ano por Donald Hebb (HEBB, 1949) que propôs um processo de reforço e de remodelamento sináptico, possivelmente envolvido com a retenção das memórias (HEBB, 1949; MILNER, SQUIRE e KANDEL, 1998; JOHANSEN et al., 2011). Somente anos após, em 1973, Bliss e Lømo demonstraram experimentalmente a potencialização de longa duração (LTP – da sigla em inglês para *Long-Term-Potentialiation*), a partir da estimulação repetida de fibras nervosas de vias hipocâmpais, o que aumentava o potencial excitatório de neurônios pós-sinápticos e sustentava a modificação da eficiência da transmissão sináptica. Este fenômeno eletrofisiológico foi sugerido mais tarde como mecanismo sináptico básico para o armazenamento de memórias (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993).

Nos anos posteriores muitos outros trabalhos surgiram e ajudaram a construir a base do que se sabe até hoje a respeito de consolidação, incluindo os modelos de “consolidação sináptica” e “consolidação sistêmica”.

O termo consolidação sináptica descreve eventos a nível molecular e/ou celular, os quais envolvem uma rede de respostas seriadas e coordenadas (IZQUIERDO et al., 2006; GOLD, 2014), que aconteceriam dentro de poucas horas após o aprendizado, relacionados à estabilização gradual da memória (MCGAUGH, 2000; WIXTED e CAI 2013). Várias estratégias farmacológicas, genéticas e de lesão seletiva permitiram um melhor entendimento dos sistemas cerebrais e dos processos moleculares envolvidos na consolidação sináptica (ABEL e LATTAL, 2001; Para revisão ver IZQUIERDO, FURINI, MYSKIW, 2016). Entre eles estão: (1) remodelamento de espinhos dendríticos em diferentes estruturas cerebrais mediante o recrutamento de receptores glutamatérgicos AMPA (LEUNER et al., 2003; RESTIVO et al., 2009;

VETERE et al., 2011); (2) cascatas de transdução de sinal intracelulares envolvendo monofosfato cíclico (AMPC) (IZQUIERDO, FURINI, MYSKIW, 2016). O AMPC, por sua vez, apresenta grande importância para a ativação de fatores de transcrição e promoção da expressão gênica (BYLUND, 2007) que acarretam na (3) síntese de novas proteínas. A sinapse ativada é então marcada por modificações pós-traducionais de proteínas sinápticas ou pela reorganização de tais proteínas (NADER, SCHAFE, LEDOUX, 2000; DUDAI, 2002).

A consolidação sistêmica, por outro lado, se refere a um processo de transferência ou reorganização estrutural da memória e descreve uma mudança tempo-dependente dos sistemas cerebrais que mantêm o traço de memória (MCCLELLAND et al., 1995; WINOCUR et al., 2010; FORCATO, FERNANDEZ, PEDREIRA, 2014). Já foi demonstrado, por exemplo, que para memórias inicialmente mais dependentes do hipocampo, como as memórias contextuais, haveria um aumento da complexidade e conectividade de regiões corticais com o tempo (DUDAI, 2004; KNIERIM, LEE, HARGREAVES, 2006; WILTGEN; SILVA, 2007). Ou seja, mudanças graduais no córtex, as quais já se iniciam com o aprendizado, se estabelecem para as memórias de longa duração, tornando o hipocampo gradualmente menos importante para armazenamento e evocação da informação (WIXTED e CAI 2013; SQUIRE et al., 2015).

1.1.2.2 A memória consolidada não é imutável: Processos de evocação, labilização e reconsolidação da memória

Por muito tempo acreditou-se que as memórias se tornavam imutáveis após sua consolidação e armazenamento (KINDT e EMMERIK, 2016). Donald Lewis desafiou esta premissa demonstrando que uma memória poderia ser modulada após sua evocação (LEWIS, 1979). Lewis e colaboradores observaram que após a apresentação de uma pista associada ao aprendizado, a memória se tornava suscetível aos efeitos amnésicos do choque eletroconvulsivo. Assim, sugeriu-se que, mediante evocação, uma memória poderia entrar em um estado lábil semelhante ao que ocorre após sua aquisição (MISANIN, MILLER, LEWIS, 1968; LEWIS, 1979). A *evocação* da memória pode ser conceitualmente definida como processo pelo qual uma informação previamente adquirida pode ser retomada (Figura 2). Este processo é composto de duas fases: *reativação* e a *expressão*, sendo a reativação relacionada à ativação dos sistemas neurais que codificam o traço de

memória, a qual pode ou não manifestar-se comportamentalmente (expressão) (LEWIS, 1979; TULVING, 1983; LEE e FLAVELL, 2014). O processo de evocação pode, em condições determinadas, levar à desestabilização da memória, tornando-a lábil novamente (MISANIN; MILLER; LEWIS, 1968; LEWIS, 1979; KINDT e EMMERIK, 2016). Os mecanismos relacionados à labilização da memória serão discutidos mais adiante.



Figura 2 – Representação esquemática dos processos de evocação e labilização de uma memória. A memória consolidada não é imutável, encontra-se apenas em um estado de estabilidade sináptica. Uma vez armazenadas, estas memórias podem ser acessadas/evocadas novamente a qualquer momento. Sobre algumas condições, este processo de evocação pode levar a desestabilização desta memória, tornando este traço de memória lábil e vulnerável a interferentes, sejam elas intervenções experimentais ou farmacológicas, capazes de alterar a memória original (adaptado de DUNBAR e TAYLOR, 2016).

Apesar da possibilidade de que uma memória pudesse ser “rearmazenada” ter sido cogitada já na década de 70 por Lewis e colaboradores, esta fase lábil adicional não recebeu tanta importância até 1997, quando Przybylski e Sara demonstraram que a memória espacial em ratos poderia ser prejudicada após a sua evocação, através do antagonismo de receptores glutamatérgicos NMDA (PRZYBYSLAWSKI; SARA, 1997). A partir daí o conceito de reconsolidação foi introduzido para explicar o processo pelo qual as memórias previamente consolidadas são estabilizadas novamente após a

evocação (Figura 3), o que seria necessário para sua permanência ao longo do tempo (NADER, SCHAFE, LEDOUX, 2000; SARA, 2000; ALBERINI 2005). Nos últimos anos, este fenômeno de reconsolidação recebeu maior atenção teórica e uma importante confirmação experimental, sendo demonstrada em uma grande variedade de espécies (incluindo os seres humanos) e em diferentes tarefas de aprendizado (NADER, SCHAFE, LEDOUX, 2000; ANOKHIN et al., 2002; EISENBERG et al., 2003). Przybylski e colaboradores (1999) demonstraram, por exemplo, a possibilidade de atenuar uma memória aversiva através do uso de um antagonista de receptores β -adrenérgicos, o propranolol, administrado após a sessão de evocação, tratando da natureza gradual do fenômeno *reconsolidação* (PRZYBYSLAWSKI, ROULLET, SARA, 1999). Nader e colaboradores (2000) também demonstraram que a inibição da síntese proteica na amígdala basolateral (ABL) após a evocação de uma memória de medo já estabelecida resultava em um prejuízo dessa memória (NADER, SCHAFE, LEDOUX, 2000).

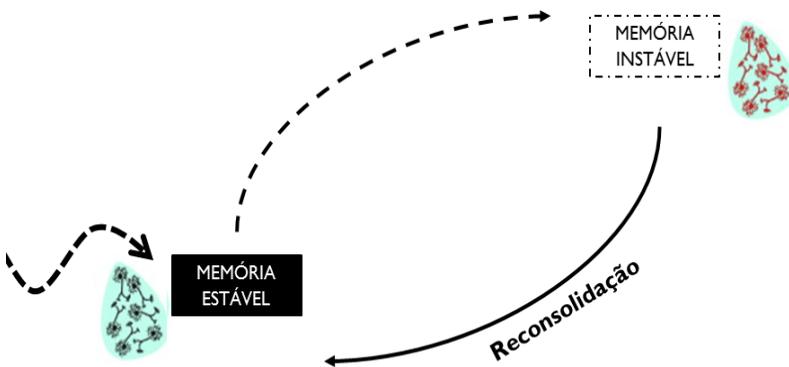


Figura 3 – Representação esquemática do processo de reconsolidação de uma memória. Uma vez labilizada, o processo de re-estabilização ou reconsolidação é iniciado para que a memória original seja mantida e/ou modificada. A reconsolidação, por sua vez, requer alguns processos bioquímicos tais como a síntese de proteínas *de novo* para o remodelamento da memória após evocação (adaptado de DUNBAR e TAYLOR, 2016).

Propõe-se que a reconsolidação apresente função dinâmica (ALMEIDA-CORRÊA E AMARAL, 2014; Para revisão ver: FORCATO, FERNANDEZ E PEDREIRA, 2014) e adaptativa, possibilitando a manutenção da precisão da memória (TRONSON e TAYLOR, 2007; HARDT et al., 2010), o enfraquecimento e/ou fortalecimento de determinadas informações da memória (SARA, 2000; DUDAI, 2006) ou a atualização (*updating*) mediante à adição de novas informações à memória previamente armazenada (MORRIS et al., 2006; LEE, 2010). Isto porque, uma vez lábil, a memória se torna novamente vulnerável e passível de modulação através de interferentes farmacológicos (MISANIN; MILLER; LEWIS, 1968; LEWIS, 1979; FRENKEL; MALDONADO; DELORENZI, 2005; TRONSON et al., 2006), alterações experimentais (DEVIETTI et al., 1973) ou ainda, através da incorporação de informações emocionais contrastantes ao traço mnemônico (ex. experiência apetitiva incorporada à uma memória traumática) (LANE et al., 2015; HAUBRICH et al., 2015; MONTI et al., 2016).

Cada vez mais aumenta o interesse em compreender os mecanismos moleculares envolvidos nos processos de desestabilização e, conseqüente, reconsolidação de uma memória (KIM, MOKI, KIDA, 2011). Já se sabe que na ausência da degradação proteica inicial, mediada pelo complexo ubiquitina-proteossoma, a memória permanece no estado consolidado (LEE et al., 2008; SOL FUSTIÑANA et al., 2014). A atividade de proteossoma, por sua vez, parece ser regulada pela concentração e expressão da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina, a CaMKII (JAROME et al., 2016). É comprovada a importância de receptores NMDA contendo a subunidade GluN₂B (BEN MAMOU et al., 2006; MONTI et al., 2016), de canais de cálcio dependente de voltagem do tipo L e do receptor canabinoide do tipo 1 (rCB1) para a desestabilização da memória (SUZUKI et al., 2008; KIM, MOKI, KIDA, 2011). Além disso, Rao-Ruiz e colaboradores (2012) comprovaram que a evocação da memória de medo contextual induz uma alteração temporal bifásica na expressão de AMPA contendo a subunidade GluA₂ no hipocampo dorsal. Este perfil de translocação (*trafficking*) de AMPA seria mediado pela atividade do receptor NMDA, o que é fundamental para a desestabilização e, conseqüente, reconsolidação da memória (LOPEZ et al., 2016). Uma vez que a reconsolidação seja caracterizada como processo de re-estabilização da memória, alguns mecanismos moleculares adicionais são comprovadamente relacionados a este processo (FORCATO, RODRIGUEZ, PEDREIRA, 2011), como por exemplo, o perfil de

translocação (*trafficking*) de AMPA, descrito anteriormente, seria gradualmente revertido ao longo do tempo de re-estabilização (RAO-RUIZ et al., 2011; JAROME et al., 2012; HONG et al., 2013). Ainda, é demonstrado que a reconsolidação requer um aumento na proporção de receptores NMDA contendo a subunidade GluN₂A (MILTON et al., 2013), o que é acompanhado do aumento da fosforilação de CREB (sigla do inglês “*cAMP response element-binding protein*”) (LIU et al., 2004). Além disso, há o aumento na expressão de zif-268 (LEE, 2010) e a síntese *de novo* proteínas para o remodelamento da memória após reativação (NADER, SCHAFFÉ, LEDOUX, 2000; LEE, 2008).

A compreensão dos aspectos dinâmicos da função mnemônica normal, no que se refere aos substratos moleculares para a labilização e reconsolidação de uma memória de medo é de suma importância para o estudo de transtornos psiquiátricos caracterizados por memórias emocionais excepcionalmente robustas e persistentes, visto que uma das estratégias mais bem estabelecidas da terapêutica atual é a interferência com a re-estabilização da memória (SOETER e KINDT, 2013).

1.2 GENERALIZAÇÃO DO MEDO

A generalização a partir de experiências passadas é um ato cognitivo que permite o recrutamento de comportamentos adequados em situações semelhantes, mas não iguais, no futuro. Roger Shepard abordou o tema “generalização” em 1987, pontuando de forma assertiva sua importância do ponto de vista adaptativo:

“Já que é improvável que qualquer objeto ou situação experimentada por um indivíduo ocorra exatamente da mesma forma ou contexto, a primeira lei geral da psicologia deve ser a lei de generalização dos estímulos.”

(SHEPARD, 1987)

A generalização do medo, por sua vez, pode ser traduzida como fenômeno através do qual um estímulo perceptualmente similar (e não necessariamente relacionado) a um evento aversivo prévio pode desencadear uma resposta comportamental semelhante. (ONAT e BÜCHEL, 2015; WHALLEY, 2015). Apesar de não se tratar de um tema recente, este fenômeno tem recebido maior atenção nas últimas décadas (SOETER e KINDT, 2013; ANDREATTA et al., 2015; TINOCO-GONZÁLEZ et al., 2015; DUNSMOOR e PAZ, 2015), não apenas por seu caráter adaptativo, mas principalmente pela importância clínica deste fenômeno e sua relação com o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (KLEIM, EHLERS, 2008; JOVANOVIĆ et al., 2009; KOSTEK et al., 2014; Para revisão ver DYMOND et al., 2014; BESNARD E SAHAY, 2015).

Este fenômeno pode ser interpretado como um processo dinâmico e esperado do ponto de vista temporal, visto que com a redistribuição gradual do traço de memória para regiões corticais (WILTGEN e SILVA, 2007; EINARSSON et al., 2015) há uma perda natural da precisão para as pistas contextuais (JASNOW et al., 2016). Desta forma, pode-se dizer que a ocorrência deste fenômeno seria uma consequência da dinâmica estrutural de processamento das memórias ao longo do tempo (WILTGEN e SILVA, 2007; EINARSSON et al., 2015), conforme descrito e observado por diversos autores para memórias remotas (DUDAI, 2004; BIEDENKAPP e RUDY, 2007; WILTGEN e SILVA, 2007; RUEDIGER et al., 2011; EINARSSON et al., 2015).

Autores destacam estruturas encefálicas associadas à generalização de medo (XU, SÜDHOF, 2013) tais como amígdala

(GHOSH e CHATTARJI, 2015), córtex pré-límbico (PORTES, 2016; VANVOSSSEN et al., 2017) e córtex cingulado anterior (EINARSSON et al., 2015; CULLEN et al., 2015). Wiltgen e colaboradores (2010) demonstraram para memórias condicionadas remotas, que o córtex seria o principal responsável por manter memórias contextuais generalizadas. Em adição ao recrutamento de regiões corticais, a região CA1 do hipocampo ventral (HV) também contribui no controle de mecanismos relacionados à generalização do medo para memórias mais antigas (Para revisão ver: JASNOW et al., 2016). No que diz respeito ao papel do hipocampo na generalização de medo (KHEIRBEK et al., 2012; GAZARINI, 2014; BESNARD e SAHAY, 2016), este já é bem reportado na regulação da especificidade de memórias episódicas através do controle de mecanismos de “*pattern completion*” (processo que permite que pistas parciais sejam capazes de reativar a memória completa, através da rede auto-associativa de neurônios piramidais da região CA3) e “*pattern separation*” (processo que permite a codificação distinta de traços de memória de experiências semelhantes), além da regulação da neurogênese hipocampal (JASNOW et al., 2016; para revisão ver KHEIRBEK et al., 2012). Nos últimos anos tem se destacado, ainda, o papel do núcleo reuniens (NR) do tálamo em controlar a especificidade e generalização através do processamento da informação, sugerido como estrutura crucial para um suposto circuito envolvendo córtex pré-frontal e hipocampo (XU, SÜDHOF, 2013).

De forma importante, alguns trabalhos já demonstraram a ocorrência da generalização de medo também para memórias recentes (descrita até um dia após formação da memória) (LYNCH et al., 2013; GAZARINI et al., 2014), relacionando-a positivamente com a potencialização da memória de medo (KAOUANE et al., 2012; GAZARINI et al., 2014). Neste caso, sugere-se que este fenômeno esteja associado a um processamento diferencial já durante a etapa de consolidação da memória aversiva, ainda que os mecanismos envolvidos não estejam totalmente elucidados (JASNOW et al., 2016).

Muito ainda precisa ser discutido a respeito da etiologia da generalização de medo, bem como sua relação com o desenvolvimento de transtornos relacionados ao trauma e estressores, levando em conta a integração de pontos de vista clínicos em curso e teorias tradicionais sobre a natureza dinâmica da memória (JASNOW et al., 2016).

1.2.1 Generalização: Importância adaptativa X Componente de memórias aversivas disfuncionais

Como já mencionado, a generalização do medo tem grande importância adaptativa, atuando como um mecanismo de alerta quando o indivíduo é exposto a situações com certa similaridade àquelas que ofertaram riscos no passado (XU e SÜDHOF, 2013; DUNSMOOR e PAZ, 2015). Especificamente para memórias aversivas, respostas defensivas raramente são limitadas a situações ou estímulos relacionados ao trauma, sempre há certo grau de generalização (XU e SÜDHOF, 2013). Apesar disso, é importante que haja especificidade (Figura 4) suficiente a fim de evitar respostas exageradas ou desnecessárias (XU e SÜDHOF, 2013; DUNSMOOR e PAZ, 2015).

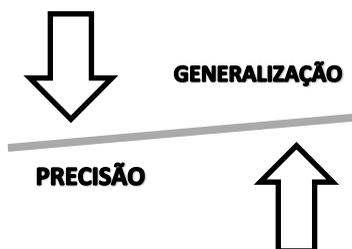


Figura 4 – Importância funcional do balanço entre precisão e generalização na dinâmica comportamental em resposta a possíveis ameaças. Para revisão ver DUNSMOOR e PAZ, 2015.

Em algumas situações, por exemplo, experiências intensamente aversivas podem ser capazes de gerar representações neurais que levem a respostas emocionais exageradas ou desajustadas por causa de uma percepção inadequada da proximidade da ameaça (BESNARD e SAHAY, 2015). Neste caso, há uma distorção da iminência de perigo, de tal forma que situações consideradas como “neutras” e não necessariamente relacionadas ao aprendizado inicialmente aversivo, desencadeiam a expressão exagerada de comportamentos defensivos (PERUSINI e FANSELOW, 2015). Este fenômeno é caracterizado como uma generalização inapropriada (ou “*over-generalization*”) por diversos autores (KHEIRBEK et al., 2012; LISSEK, 2012; BESNARD e SAHAY, 2015).

Desta forma, é crescente o número de trabalhos que discutem a importância da generalização do medo como uma característica determinante no desenvolvimento de transtornos relacionados ao trauma e estressores (LISSEK, 2012; TINOCO-GONZÁLEZ et al., 2015), como o Transtorno de Estresse Pós Traumático (TEPT), nos quais a expressão de medo se dá excessivamente e/ou de tal forma que não possa ser atribuída a uma situação ou objeto específico, perdendo seu caráter adaptativo e protetor (KHEIRBEK et al., 2012).

1.2.2 Estudo da generalização do medo: Protocolo de condicionamento aversivo contextual

No que se refere ao estudo das bases neurais que sustentam o aprendizado associativo desde a experiência, armazenamento de memórias e expressão comportamental, maiores avanços, principalmente em modelos pré-clínicos, têm sido feitos através de estudos utilizando o condicionamento de medo pavloviano e suas variações. Este protocolo foi primeiramente proposto por Pavlov (1927) e é considerado até hoje como uma ferramenta muito útil e que permite, também, o estudo de memórias aversivas, a compreensão de suas fases e características, estruturas encefálicas envolvidas, além de drogas capazes de interferir com sua formação e manutenção (AGREN, 2014).

O condicionamento aversivo é um processo através do qual um estímulo neutro (EN, incapaz de causar, por si só, alguma resposta comportamental; ex.: som ou pista contextual) pode ser associado à apresentação de um estímulo incondicionado (EI, aquele naturalmente capaz de induzir uma resposta comportamental específica; ex.: choque nas patas), tornando-se, então, um estímulo condicionado (EC) capaz de gerar respostas defensivas por si só. Quando o animal se depara novamente com o EC (aquele que anteriormente possuía caráter neutro), respostas comportamentais defensivas (ex.: congelamento ou “*freezing*”), autonômicas (ex.: aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial) e/ou endócrinas (ex.: secreção de hormônios) são desencadeadas (LEDOUX, 2000).

De forma mais específica, para o estudo da generalização do medo através do protocolo de condicionamento aversivo, considera-se “generalização” quando a resposta defensiva é expressa mesmo mediante apresentação de um estímulo que não tenha sido previamente pareado ao EI (TINOCO-GONZÁLEZ et al., 2015). Diversos autores

propõem e associam manipulações capazes de interferir na associação contextual, de tal forma a induzir uma generalização das respostas defensivas (Figura 5), como por exemplo, estresse prévio (BUSTOS et al., 2010), aumento na quantidade/intensidade de choques (BALDI, LORENZINI, BUCHERELLI, 2004; POULOS et al.; 2016) ou tratamentos farmacológicos durante o condicionamento (KAOUANE et al., 2012; GAZARINI et al., 2014). Neste caso, percebe-se a importância da magnitude e a valência da experiência aversiva que gera o aprendizado associativo (ITZHAK; PEREZ-LANZA; LIDDIE, 2014).

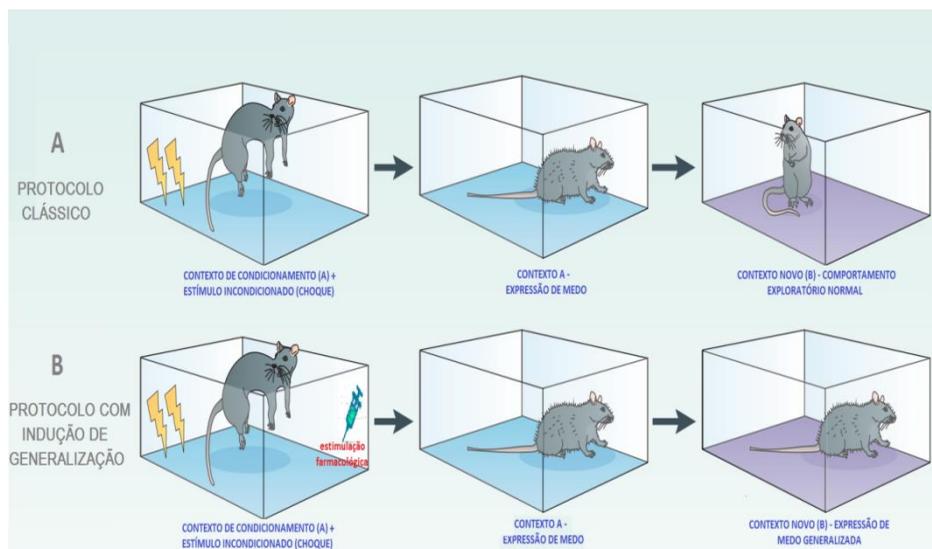


Figura 5 – Condicionamento contextual aversivo e o estudo da generalização do medo. A - No protocolo clássico, após receber choques nas patas em um determinado contexto (contexto A) durante o condicionamento, os animais associam tal contexto ao evento aversivo. Quando expostos a um contexto não-pareado (contexto B), não evocam respostas defensivas quaisquer. B - Para o estudo da generalização do medo, estratégias podem ser adotadas e adaptadas no protocolo, como estimulação farmacológica, de modo que a expressão de medo, outrora específica para o contexto condicionado, seja agora generalizada ao contexto dissociado. (Figura adaptada de MAREN, PHAN, LIBERZON, 2013; Para revisão ver DUNSMOOR e PAZ, 2015).

Recentemente, alguns tipos de manipulações que visam à indução da generalização de medo, partindo do protocolo de condicionamento aversivo contextual têm sido discutidos por nosso grupo de pesquisa. Foi demonstrado que a manipulação farmacológica através da

administração de ioimbina (IOI), antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos, imediatamente após o condicionamento seria capaz de provocar a indução da generalização do medo (GAZARINI et al., 2014), devido a um aumento na concentração de noradrenalina e consequente ativação de receptores β -adrenérgicos localizados no hipocampo dorsal, especialmente os subtipos β_2 e β_3 (GAZARINI, 2015). Também já foi demonstrado efeito da micro-estimulação do córtex pré-límbico, tanto com NMDA (VANVOSSSEN et al., 2017) quanto com noradrenalina (PORTES, 2016), em provocar tal comportamento, relacionando ainda o papel de mais esta estrutura na neurobiologia da generalização de medo.

Ainda, importante reforçar, apesar do protocolo de condicionamento de medo contextual ser uma ferramenta útil no estudo de memórias aversivas e mesmo no estudo da generalização do medo (JASNOW et al., 2016) não existe modelo animal que recrie inteiramente condições clínicas e comportamentos de pacientes expostos a traumas (DESMEDT, MARIGHETT, PIAZZA, 2015).

1.3 MODULANDO MEMÓRIAS AVERSIVAS

O termo “modulação”, aplicado às memórias, se refere à regulação de processos que participam do armazenamento delas mesmas (GOLD, 2014), o que pode ser realizado de diversas formas (HAMANN, 2001; MCGAUGH, 2013; DUNBAR e TAYLOR, 2016). A pesquisa acerca da manipulação experimental da memória iniciou-se com estudos que avaliaram os efeitos de drogas no aprendizado (ROOZENDAAL e MCGAUGH, 2011), sendo que o primeiro estudo documentado foi realizado por Lashley (1917), no qual demonstrou que baixas doses de estricnina administradas previamente ao treino em um labirinto, eram capazes de melhorar o desempenho destes animais. Nos anos posteriores, surgiram os estudos de “amnésia retrógrada”, mencionados anteriormente (DUNCAN, 1949; MCGAUGH 1966; MCGAUGH e HERZ, 1972), os quais empregaram a modulação negativa da memória através de tratamentos efetuados ligeiramente após o treino.

A propriedade temporal de tratamentos pós-treino/pós-evocação revelam a janela disponível até a formação de uma nova memória (IZQUIERDO et al., 1999) e de sua reconsolidação (NADER, SCHAFE, LE DOUX, 2000; SARA, 2000), respectivamente. Diz-se que tais intervenções atuam de maneira retrógrada e tempo-dependente, visto que os estudos nesta área têm como achado comum que os tratamentos influenciam a memória quando administrados logo após o treino/evocação e são menos efetivos quando administrados várias horas ou mais após (Para revisão: MCGAUGH e HERZ, 1972; MCGAUGH, 2000).

As interferências efetuadas imediatamente após uma experiência interferem na consolidação e formação da memória, enquanto que após uma sessão de evocação (desde que esta seja suficiente para desestabilizar a memória previamente armazenada) são capazes de interferir com sua reconsolidação (NADER e HARDT, 2009; FORCATO, FERNANDEZ, PEDREIRA, 2014; DUNBAR e TAYLOR, 2016). Em geral, para estudo de manipulações capazes de modular memórias traumáticas, a maior vantagem para a clínica seria com foco no prejuízo da etapa de reconsolidação (DUNBAR e TAYLOR, 2016), visto que dificilmente os pacientes procuram acompanhamento logo no início do trauma. Além disso, manifestações clínicas de transtornos afetivos podem levar tempo a se evidenciarem (AMOS, STEIN, IPSER, 2014; *American Psychiatric Association*, 2013).

1.3.1 Modulação noradrenérgica no processamento das memórias aversivas

Ferramentas farmacológicas têm sido utilizadas em estudos que buscam elucidar o envolvimento de sistemas de neurotransmissão e/ou regiões cerebrais específicas na formação e manutenção memórias emocionais (THOME et al., 2016). O sistema noradrenérgico, por exemplo, tem sido implicado como um importante modulador de memórias aversivas (MCGAUGH, 2000; HAMANN, 2001; DUDAI, 2004; VAN STEGEREN, 2008; MCGAUGH e ROOZENDAAL, 2009; JOËLS, FERNANDEZ, ROOZENDAAL, 2011; ROOZENDAAL e MCGAUGH, 2011), tanto com base em seus efeitos diretamente em nível de sistema nervoso central (VAN STEGEREN, et al., 1998) quanto na combinação da estimulação central e periférica (O'CARROLL, et al., 1999).

O sistema noradrenérgico participa do controle de funções emocionais e cognitivas através da regulação do sistema simpatoadrenomedular (SAM). A adrenalina, principal representante deste sistema a nível periférico, é liberada a partir da medula adrenal na corrente sanguínea em resposta ao estresse (MCCARTY e GOLD, 1981). Apesar de não atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), a adrenalina pode influenciar mecanismos centrais através de suas ações periféricas (GOLD, 2014) como, por exemplo, através da ativação de receptores β -adrenérgicos localizados em neurônios aferentes no nervo vago, os quais transmitem a informação ao sistema nervoso central (GOLD, 2014). Além da adrenalina, o sistema noradrenérgico é composto por outra catecolamina endógena, a noradrenalina, que atua majoritariamente como neurotransmissor ao modular diversas funções centrais (YAMAMOTO, SHINBA, YOSHII, 2014).

Estas catecolaminas atuam através da ativação de receptores adrenérgicos específicos. Estes são classificados em subtipos, de maneira geral, em β , α_1 e α_2 (BYLUND, 2007), os quais recrutam vias de sinalização distintas e são expressos em proporções diferentes em áreas cerebrais relacionadas com as memórias (NICHOLAS, HÖKFELT, PIERIBONE, 1996).

Em situações fisiológicas, a liberação de adrenalina e noradrenalina tem um papel fundamental na atenção, na vigília e no processamento mnemônico (STARKE, 2001), sobretudo devido à facilitação de alterações plásticas em estruturas essenciais para a formação e manutenção de memórias (GOLD, 2014). A ativação de

receptores β -adrenérgicos, por exemplo, durante a consolidação é demonstrada por potencializar a LTP (MONDACA et al., 2004).

Qualquer influência emocional ou de atenção durante o armazenamento da informação influencia na representação mnemônica que será criada (HAMANN, 2001). Por este motivo, diversos autores destacam o papel do sistema noradrenérgico como um dos reguladores hormonais de memórias mais potentes e mais reconhecidos (AGREN, 2014; GOLD e VAN BUSKIRK, 1975, 1978; HAMANN, 2001), principalmente as aversivas, nas quais há grande envolvimento emocional e de atenção.

1.3.1.1 Sistema noradrenérgico na potencialização da memória aversiva: Ioimbina como indutor de generalização

Manipulações do sistema noradrenérgico, principalmente visando à estimulação, têm sido realizadas no intuito de mimetizar, em modelos animais, condições que possam induzir características de “memórias disfuncionais”, como a generalização de medo.

A administração sistêmica de um antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos, a ioimbina (IOI) (IVANOV e ASTON-JONES, 1995), como ferramenta para potencializar memórias aversivas já foi relatada, inclusive na indução da generalização de medo (Humanos: SOETER e KINDT, 2012. Roedores: GAZARINI et al., 2014; VANVOSSSEN et al., 2017). O receptor adrenérgico do subtipo α_2 está envolvido no controle de liberação de noradrenalina pelo *locus coeruleus* (LC) para o sistema nervoso central como autoceptor. Assim, o antagonismo destes receptores permite maior liberação deste neurotransmissor em regiões cerebrais importantes no processamento de memórias emocionais (ABERCROMBIE, KELLER, ZIGMOND, 1988; IVANOV e ASTON-JONES, 1995; CRESPI, 2009).

Vale destacar que a afinidade de ligação da noradrenalina aos subtipos de receptores adrenérgicos é distinta, sendo os receptores α_2 e α_1 são ativados primariamente frente a liberação de níveis intermediários de noradrenalina em condições fisiológicas (ZHANG; OUYANG; THOMAS, 2004). Por outro lado, porém, uma vez que o nível de ligante disponível encontra-se aumentado após administração de IOI, há um favorecimento da ativação de receptores β -adrenérgicos nestas regiões (GAZARINI et al., 2013), receptores estes cujo papel é estimulatório (na maioria das vezes, acoplados a proteínas G estimulatórias, aumentando a

atividade da adenil-ciclase e a concentração de AMPc) (BYLUND, 2007), o que indica que a potencialização da consolidação seja uma consequência deste favorecimento (GAZARINI et al., 2013).

1.3.1.2 Sistema noradrenérgico e a reconsolidação da memória aversiva: clonidina como droga amnésica

A possibilidade de atenuar componentes indesejados de memórias aversivas muito intensas (tais como a expressão de medo generalizado) através do bloqueio de reconsolidação tem sido de grande interesse nos últimos anos (SARA 2000; DUDAI, 2004; CAIN, MAYNARD, KEHNE, 2012; PARSONS e RESSLER, 2013; ALBERINI e LEDOUX, 2013; SCHWABE, NADER, PRUESSNER, 2014). Drogas capazes de enfraquecer memórias através do prejuízo dos processos de consolidação ou reconsolidação são chamadas amnésicas, como por exemplo, os inibidores de síntese proteica, antagonistas de receptores NMDA ou moduladores adrenérgicos (GAMACHE, PITMAN, NADER, 2012), cada qual com seu mecanismo de ação independente.

A clonidina (CLO), um agonista de receptores α_2 -adrenérgicos, é utilizada na pesquisa pré-clínica como droga amnésica (GOZZANI, IZQUIERDO, 1976; GALEOTTI, BARTOLINI, GHELARDINI, 2004; GAMACHE, PITMAN, NADER, 2012). Sua ação é dada pela ativação de autoreceptores pré-sinápticos (GALEOTTI, BARTOLINI, GHELARDINI, 2004), o que culmina na inibição de canais de cálcio voltagem-dependentes e, conseqüentemente, na inibição da liberação de noradrenalina (GAMACHE, PITMAN, NADER, 2012). A menor disponibilidade de noradrenalina prejudica processos essenciais para a manutenção das memórias (ABERCROMBIE, KELLER, ZIGMOND, 1988; RASMUSSEN, JACOBS, 1988; DEBOCK et al., 2003; MONDACA et al., 2004; LI et al., 2013).

1.3.2 O desafio a respeito de memórias “disfuncionais”: importância da labilização para a efetividade da modulação.

Embora a demonstração original do processo de reconsolidação tenha sido replicada em outros paradigmas (KINDT e EMMERIK, 2016), já se sabe que algumas memórias são menos susceptíveis à modulação após evocação (CAMMAROTA et al., 2004; NADER,

2015). Diversos estudos têm demonstrado que drogas amnésicas clássicas – como, por exemplo, o canabidiol (GAZARINI, 2012; VANVOSSSEN et al., 2017), a clonidina (GAZARINI, 2012) e o midazolam (BUSTOS, 2010) - mostraram-se ineficientes em casos específicos. Nestes estudos, os autores sugerem que tais memórias apresentariam certa resistência à labilização, o que poderia sugerir que a reconsolidação não é uma propriedade universal das memórias (NADER e HARDT, 2009; NADER, 2015; DUNBAR e TAYLOR, 2016).

Os resultados negativos parecem definir determinadas condições nas quais as memórias não são suscetíveis a uma alteração permanente, ou seja, condições limitantes para a reconsolidação (FORCATO, RODRIGUEZ, PEDREIRA, 2011; NADER, 2015; THOME et al., 2016; DUNBAR e TAYLOR, 2016). Por exemplo, memórias aversivas mais intensas (SUZUKI et al., 2004; FORCATO et al., 2007; WANG, DE OLIVEIRA ALVARES, NADER, 2009) ou mais antigas (MILEKIC e ALBERINI, 2002; FRANKLAND et al., 2006; BUSTOS et al., 2009; INDA et al., 2011) tendem a apresentar um perfil de desestabilização/reconsolidação diferente (SOETER e KINDT, 2013; GAZARINI et al., 2014; VANVOSSSEN et al., 2017), apesar de os mecanismos envolvidos ainda não estarem totalmente esclarecidos. Além disso, também já foi demonstrado que detalhes experimentais referentes à sessão de reativação exercem efeito direto na capacidade de desestabilização/reconsolidação de uma memória (PEDREIRA e MALDONADO, 2003; BUSTOS et al., 2010).

Muitas vezes, o emprego de alternativas farmacológicas capazes de facilitar o processo de desestabilização da memória faz-se necessário. Algumas drogas apresentam tal ação comprovada em modelos animais, como, por exemplo: a ACEA (Aracdonil-2-cloroetilamida), um agonista do receptor CB1 (LEE e FLAVELL, 2014) e; a D-cicloserina, um agonista parcial de receptores glutamatérgicos NMDA (BUSTOS et al., 2010; GAZARINI et al., 2014; ESPEJO et al., 2016). Além disso, pequenas intervenções experimentais metodológicas já podem ser capazes de favorecer a desestabilização de memórias disfuncionais (ex. aumento da duração da sessão de evocação) (LEE et al., 2008; BUSTOS et al. 2010).

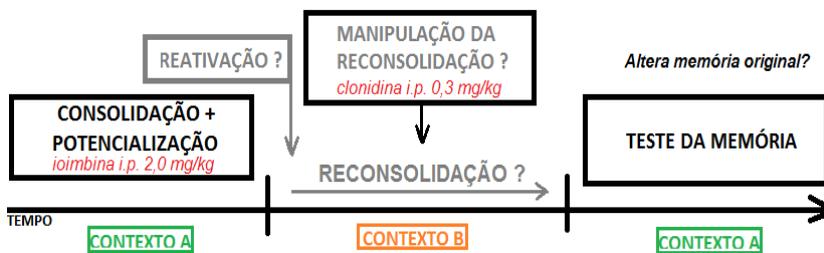
Estes achados, juntamente aos de outros trabalhos importantes da literatura (GAMACHE, PITMAN, NADER, 2012; HAUBRICH et al., 2015; MONTI et al., 2016), destacam a importância da labilização e a necessidade de se compreender melhor este processo para a efetividade da manipulação de memórias aversivas consideradas “disfuncionais”.

1.3.3 Modulação da generalização como estratégia de intervenção em memórias aversivas

Trabalhos clássicos da literatura estudam a reconsolidação como uma oportunidade para a modulação de características negativas de memórias aversivas (NADER, SCHAFE, LE DOUX, 2000; SARA, 2000; DUNBAR e TAYLOR, 2016), visto que manipulações farmacológicas realizadas nessa janela temporal poderiam alterar o conteúdo emocional da memória propriamente dita. O que aconteceria se tentássemos aplicar este conceito ao fenômeno de generalização de medo?

Apesar do crescente número de estudos a respeito da generalização de medo, pouco se sabe sobre a neurobiologia deste fenômeno. O que se especula neste trabalho é a possibilidade de desestabilizar ou labilizar a memória original através da exposição a um contexto não associado, no qual se expressa resposta generalizada de medo. Assim, a hipótese do presente estudo é de que a expressão de medo generalizada, observada em um contexto diferente daquele pareado com um estímulo aversivo, se dá pela evocação da memória original. Logo, a utilização de ferramentas farmacológicas antes e/ou após a este evento poderia promover a modulação da memória de medo original, atenuando seu impacto exacerbado.

Desta forma, optamos por explorar abordagens farmacológicas e conceituais bem estabelecidas na literatura, empregando-as em estratégias metodológicas adaptadas, procurando, desta forma, novas alternativas que possam ser úteis na atenuação de memórias traumáticas “disfuncionais”. Seguindo os desenhos experimentais clássicos de estudo da reconsolidação (figura 6), a diferença em nossa abordagem proposta é que a manipulação da reconsolidação dar-se-ia em um contexto diferente do original, onde o animal expressa comportamento generalizado de medo.



6 – Representação esquemática da abordagem proposta: generalização como estratégia de modulação de memórias aversivas – fundamentada no bloqueio de reconsolidação (adaptado de AGREN, 2014).

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar os efeitos de intervenções farmacológicas antes e/ou após a expressão generalizada de medo sobre a resposta de medo condicionada ao contexto pareado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar a dose de ioimbina capaz de provocar generalização das respostas de medo;
- Avaliar a influência de modificações do protocolo de condicionamento de medo ao contexto na resposta de medo generalizada;
- Investigar se a administração de ioimbina promove sensibilização das respostas defensivas;
- Avaliar o efeito da administração de clonidina após uma ou duas exposições ao contexto não-associado (no qual há expressão generalizada de medo) sobre a resposta de medo condicionada ao contexto pareado;
- Investigar o efeito da facilitação de labilização, farmacologicamente ou não, sobre a ação da clonidina após uma exposição ao contexto não-pareado (no qual há expressão generalizada de medo);
- Avaliar o efeito de intervenções farmacológicas após a expressão generalizada de medo sobre a resistência da memória aversiva original à ação amnésica da clonidina no contexto pareado;
- Investigar o envolvimento do hipocampo como sítio de labilização necessário para a modulação da resposta de medo condicionada, partindo de intervenções farmacológicas após a expressão generalizada de medo.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Neste estudo foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, entre 3 a 4 meses de idade e peso entre 280 e 350 g. Já em nosso biotério, foram alojados em caixas moradia padrão de polipropileno (36 x 30 x 15 cm) em, no máximo, cinco animais por caixa, por no mínimo uma semana antes dos experimentos. Os animais tiveram acesso à 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 07h00 min). 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) e foram seguidas as normas internacionais do cuidado e bem estar animal, utilizando o mínimo de animais para a obtenção de análises estatísticas confiáveis.

3.2 Drogas

Cloridrato de ioimbina, antagonista α_2 -adrenérgico (IOI; 1,0 ou 2,0 mg/kg; Tocris, EUA) e cloridrato de clonidina, agonista α_2 -adrenérgico (CLO; 0,3 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA) foram dissolvidos em água destilada e administrados sistemicamente (i.p.) no volume de 1,0 ml/kg. As doses de IOI foram selecionadas com base em experimentos preliminares do laboratório (GAZARINI et al, 2014), sendo necessário um ajuste de dose já no início do projeto, e também com base em trabalhos que demonstraram o papel dessa droga na indução da LTP *in vivo* (MONDACA et al., 2004). A dose de CLO foi selecionada também com base em experimentos preliminares do laboratório (GAZARINI et al, 2014), em estudos que demonstraram o seu efeito amnésico no condicionamento contextual (GAMACHE, PITMAN, NADER, 2012), em trabalhos que demonstram efeito da CLO em reduzir a liberação de noradrenalina no cérebro (ABERCROMBIE, KELLER, ZIGMOND, 1988) e prejudicar a LTP *in vivo* (MONDACA et al., 2004). D-cicloserina (DCS; 15 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA) foi dissolvida em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%). A dose de DCS foi a mesma capaz de facilitar a desestabilização de memórias emocionais intensas, sem interferir na evocação ou expressão da

memória de medo contextual (BUSTOS et al., 2010; GAZARINI et al., 2014). Ifenprodil (IFEN 1 mg/ml; Sigma-Aldrich, EUA) foi dissolvido em PBS (solução salina tamponada com fosfato) e administrado bilateralmente por microinjeção no hipocampo dorsal (volume de 0,5 µl/hemisfério a uma taxa de 0,33 µl/min, ou seja, 0,5 µg/hemisfério). A concentração de IFEN foi selecionada com base em trabalhos que demonstraram seu efeito em prevenir a desestabilização da memória, quando administrado no hipocampo dorsal anteriormente à evocação (HAUBRICH et al., 2015).

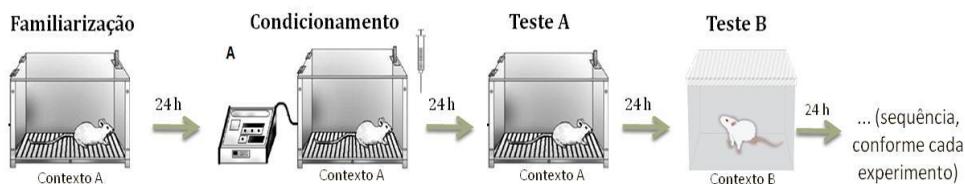
3.3 Condicionamento de medo contextual

3.3.1 Equipamentos: 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 tampa removível feitas de acrílico, definido como Contexto A. A aplicação de choques elétricos nas patas dos animais foi possível devido a um dispositivo gerador de choques elétricos (Insight, Ribeirão Preto, Brasil), conectado ao piso gradeado (barras de aço inoxidável de 3 mm de diâmetro) do Contexto A. Para a avaliação de respostas condicionadas de medo, os testes foram realizados nesta mesma caixa, porém sem a aplicação de choques. Por outro lado, para avaliação da ocorrência de generalização das respostas defensivas, foi utilizada uma segunda caixa como contexto não-pareado, designada Contexto B, feita de acrílico e com uma tampa também de acrílico (30 x 30 x 30 cm), completamente transparente.

3.3.2 Protocolos: A sequência básica do protocolo de condicionamento de medo contextual é representada na figura 7, sendo que alterações e particularidades de cada experimento serão destacadas quando se fizer necessário. O protocolo padrão de condicionamento (figura 7A) foi elaborado com base em experimentos prévios de padronização do laboratório. As sessões foram sempre espaçadas entre si por um período de 24 h. Cada animal foi colocado no Contexto A, sendo permitida a exploração livre (3 min), durante uma sessão inicial de *familiarização*, com o objetivo de permitir o reconhecimento do aparato experimental. No dia seguinte, o animal foi exposto novamente ao Contexto A para a sessão de treino (ou *condicionamento*), durante a qual ele recebeu, após 30 s iniciais (período pré-choque), três choques elétricos nas patas (0,7 mA, 60 Hz, por 3 s) com intervalo de 30 s entre cada choque. 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*). Por fim, após mais um dia, os animais foram expostos ao Contexto B (3 min), a fim de avaliar a ocorrência de *generalização* do medo frente a um contexto não pareado (*Teste B*). Contudo, em algumas situações foi adotado um protocolo modificado (figura 7 B), de acordo com o que será apresentado nos resultados. Esta modificação foi acompanhada de devida padronização. Neste protocolo, a sessão de *evocação* foi omitida e a exposição à caixa nova (*Contexto B*) foi dada em uma sala também diferente da sala onde foi realizado o condicionamento, já que essa condição representa-se com pistas contextuais proximais e globais tão diferentes quanto possível da situação aversiva original.

A – Protocolo padrão



B – Protocolo modificado

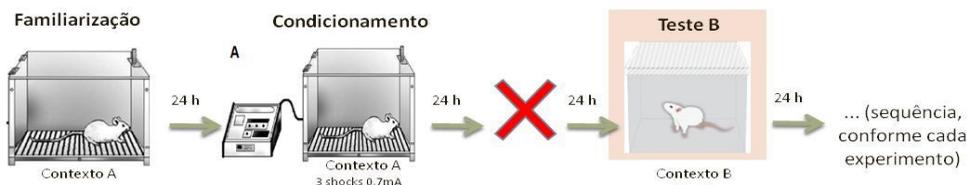


Figura 7 – Representação esquemática dos protocolos de condicionamento de medo contextual utilizados neste trabalho.

3.3.3 Manipulações farmacológicas: Para a primeira sessão de dados, as intervenções farmacológicas foram realizadas imediatamente após a sessão de condicionamento, com a administração de IOI ou veículo para indução da generalização do medo. Já para o segundo conjunto de dados, a estimulação noradrenérgica com IOI após a sessão de treino foi um fator invariável, a fim de otimizar a realização dos

experimentos e a interpretação dos mesmos conforme os objetivos deste trabalho. Quando a intenção foi a de usar a resposta de medo generalizada como ferramenta para intervenção com a memória aversiva, os animais foram expostos ao Contexto B (3 min), sendo as manipulações realizadas ligeiramente antes e/ou imediatamente após esta sessão.

3.3.4 Considerações gerais: Todos os experimentos comportamentais foram realizados com luminosidade de 60 lux e ocorreram entre às 12h00 e 18h00. Importante salientar que antes de qualquer teste, os animais foram deixados para ambientar na antessala do experimento por 30 minutos, a fim de reduzir qualquer estresse ou desconforto desnecessário. 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 análise posterior 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.

3.4 Procedimentos para micro-infusão intracerebral

3.4.1 Cirurgia estereotáxica: Em uma sala específica e preparada para tal fim, os animais foram anestesiados com uma solução (via i.p.) de quetamina (100 mg/ml/kg; Cetamin®, Syntec Ltda., Brasil) e xilazina (10 mg/ml/kg; Xilazin®, Syntec Ltda., Brasil) e, após a perda total dos reflexos, foi realizada a tricotomia da região craniana. Os animais, então, foram fixados em aparelho estereotáxico para ratos (Stoelting, EUA). Uma solução de álcool iodado (2%) foi utilizada para assepsia da região craniana e a injeção s.c. de uma solução de lidocaína 3% com adrenalina 1:50.000 (Lidostesim®, Dentsply Pharmaceutical, Brasil) foi aplicada para promover anestesia local e minimizar o sangramento. Uma pequena porção da pele do animal foi retirada, permitindo a raspagem do periósteo e a exposição do crânio e das suturas lambdóide e coronal. O crânio de cada animal foi perfurado com o auxílio de uma broca odontológica, a fim de permitir a fixação de dois parafusos oftálmicos de aço inoxidável, bem como inserção de cânulas-guia (confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas de 25,0 x 7,0 mm, ajustadas para um

comprimento de 11,0 mm). As coordenadas referentes ao hipocampo dorsal foram obtidas do atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (2009) (3,5 mm posterior ao Bregma, \pm 2,5 mm relativo ao eixo lateral e -2,0 mm relativo ao eixo dorso-ventral), sendo as cânulas-guia implantadas bilateralmente. Por fim, para fixação das peças e proteção contra infecções, a área exposta foi coberta por um capacete moldado de acrílico odontológico autopolimerizável. Em cada uma das cânulas-guia, ainda, foi inserido um fio de aço inoxidável (nº 24) para protegê-las de obstrução. Ao término do processo cirúrgico, uma injeção s.c. de banamine (2,5 mg/kg; Schering-Plough, Brasil), um agente analgésico, antipirético e anti-inflamatório foi aplicada no animal. Após isso, os animais foram retirados do aparelho estereotáxico e mantidos em ambiente aquecido para evitar hipotermia causada pela anestesia. Um período de 10 dias foi reservado para a recuperação dos animais, sem a realização de nenhum procedimento experimental.

3.4.2 Infusão intracerebral de ifenprodil: Para experimentos que requeriam a infusão bilateral de drogas diretamente no HD, agulhas medindo 12,4 mm (confeccionadas a partir de agulhas gengivais de 30G) foram conectadas a um tubo de polietileno (PE10; Clay Adams, EUA) acoplado a uma microseringa (Hamilton, EUA) de 5 μ l. No momento da infusão, o tubo de polietileno foi preenchido 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. 15 minutos antes do teste, o animal foi cuidadosamente imobilizado para remoção do fio de aço com auxílio de um alicate e desobstrução da cânula com uma lima odontológica (K-FILE Colorinox® A012D, Dentsply Ind. Com.Ltda., Brasil) de 11,0 mm. Em seguida, a agulha foi introduzida na cânula-guia e, com auxílio de uma bomba de infusão (Insight, Brasil), cada animal recebeu 0,5 μ l da solução de Ifenprodil (1 mg/ml em PBS) por hemisfério, infundidos simultaneamente a uma taxa de infusão de 0,33 μ l/min. Após a injeção, a agulha foi mantida por 30 s adicionais para reduzir refluxo da solução.

3.4.3 Análise histológica: Ao término dos experimentos, os animais receberam uma injeção i.p. de solução anestésica contendo cloral hidratado (30% p/v; 3 ml/animal; Vetec, Brasil), seguida pela infusão intracerebral bilateral de azul de Evans (0,2 μ l/hemisfério) aplicada através das cânulas-guia. Após decapitação, os encéfalos foram retirados e conservados em solução de formalina 10%. Para a verificação do sítio de injeção da droga, os encéfalos foram

armazenados durante 48 h em solução de sacarose 30% e cortes coronais (50 μm) foram obtidos utilizando criostato (Leica CM 1850, Alemanha) a uma temperatura aproximada de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foi realizada a fixação dos cortes em lâminas de vidro gelatinizadas que, após secagem, 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 para estabilidade e armazenamento. As lâminas foram escaneadas em um Digitalizador de Lâminas Axio Scan®, processadas em um programa de captura de imagens Zeiss Blue® e comparadas com os diagramas do cérebro de ratos (PAXINOS, WATSON, 2009). A análise histológica foi realizada de maneira cega, e apenas os animais com histologia bilateral confirmada para o HD foram incluídos na análise estatística.

Análise histológica

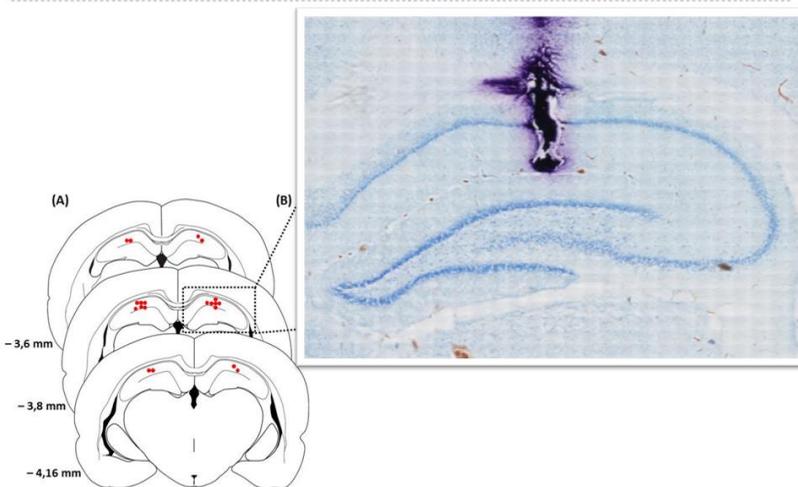


Figura 8 - Análise histológica das microinjeções no hipocampo dorsal. (A) Diagramas de cortes coronais do cérebro de ratos representando os sítios de injeção no HD (pontos vermelhos). (B) Fotomicrografia obtida com o uso do Digitalizador de Lâminas Axio Scan, a partir do sítio de injeção no HD (aproximadamente 3,8 mm posterior ao Bregma), com as camadas bem marcadas e comparáveis ao atlas de apoio. (Adaptado de PAXINOS, WATSON, 2009).

3.5 Análises estatísticas

Após assegurar a distribuição normal das amostras, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias. Quando os animais foram re-expostos ao mesmo contexto (A ou B), 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® 12 (StatSoft Inc., EUA) e foram representados em gráficos confeccionados com o GraphPad Prism ® 5 (GraphPadPrism, EUA). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e todas as representações acompanham esquemas que indicam o protocolo experimental adotado e momentos da administração de drogas, para maior entendimento dos dados plotados.

RESULTADOS

Sessão 1 de dados – CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA DE MEDO GENERALIZADA

Experimento 1 – Seleção da dose de IOI capaz de provocar generalização das respostas de medo

A fim de selecionar a melhor dose de ioimbina capaz de provocar a generalização das respostas de medo em um contexto não-pareado (Contexto B), 27 animais foram alocados em três grupos independentes ($n = 8-10/\text{grupo}$) com base no tratamento sistêmico com veículo ou ioimbina (via i.p. de 1,0 ou 2,0 mg/kg) realizado imediatamente após a sessão de condicionamento. Além disso, para avaliar se este comportamento é mantido por até 21 dias (uma memória considerada remota), os animais foram retestados nos contextos A e B, 21 dias após o condicionamento.

Para o Teste A, a ANOVA de uma via com medidas repetidas demonstrou que não houve diferença entre os grupos com relação ao tratamento ($F_{2,24} = 2,361$, $P = 0,12$), conforme representado na figura 9, onde valores semelhantes de tempo de congelamento foram observados para os grupos (Teste A1). Isso se deve provavelmente ao fato de que o estímulo incondicionado, por si só, já tenha sido capaz de provocar um nível máximo de congelamento (treino forte padronizado para atingir níveis próximos a 80% de tempo de congelamento). Para a repetição, a ANOVA de uma via com medidas repetidas indica diferenças entre o Teste A2 e o Teste A1 ($F_{1,24} = 17,885$, $P = 0,0003$). A interação entre os fatores repetição e tratamento não indicou diferenças significativas ($F_{2,24} = 2,488$, $P = 0,10$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revela uma queda na resposta condicionada do grupo controle na sessão do teste A2 ($P = 0,001$) em relação à sessão do teste A1. Já para o grupo tratado com Ioimbina na dose de 2,0 mg/kg, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou um efeito persistente ($P = 0,04$) sobre a resposta condicionada no Teste A2 em relação ao grupo controle, o que sugere mais ainda o seu papel reforçador na consolidação desta memória aversiva.

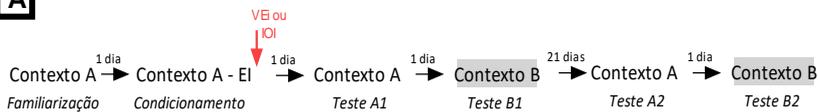
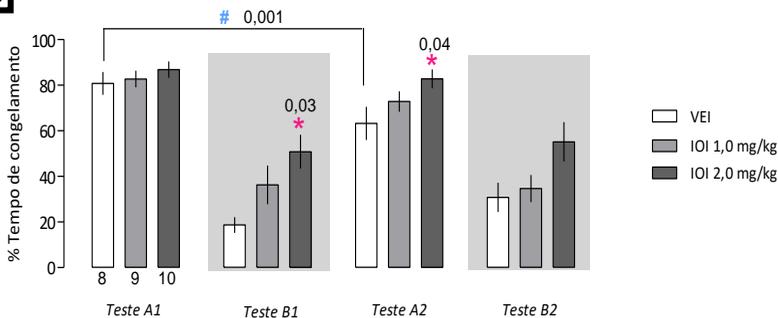
A**B**

Figura 9. A administração de ioimbina imediatamente após o condicionamento é capaz de induzir a generalização das respostas de medo e apresenta papel sobre a persistência da resposta condicionada ao contexto pareado. A - Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI 1,0 ou 2,0 mg/kg, i.p) foram administrados logo após o condicionamento da memória de medo contextual. A seta indica o momento do tratamento. B - Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Evocação, Teste A) ou ao novo (Teste B). Onde: * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle, # indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação à repetição (ANOVA com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls). O número na base das primeiras barras corresponde ao “n” de animais para cada grupo.

Com relação ao Teste B, em um contexto não-pareado (contexto B) e dissociado do estímulo aversivo original, diferenças na resposta de medo são evidentes na sessão de Teste B1, no qual a ANOVA de uma via com medidas repetidas demonstrou um efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento ($F_{2,24} = 5,0306$, $P = 0,015$). Para a re-exposição nas sessões de Teste B1 e B2, a ANOVA de uma via com medidas repetidas não indica diferenças entre os testes ($F_{1,24} = 1,6994$, $P = 0,20$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que os animais tratados com 2,0 mg/kg de ioimbina apresentaram tempo de congelamento significativamente maior neste contexto não-pareado em relação aos animais tratados com veículo ($P = 0,03$), conforme observado na figura 9, comportamento este que tratamos aqui como

generalização da resposta de medo. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revela uma tendência de aumento na resposta generalizada do grupo controle na sessão do teste B2 ($P = 0,08$) em relação à sessão do teste B1, característica de uma provável perda de especificidade natural que possa acontecer com memórias remotas. Ainda com base no teste B, visto que a resposta de medo generalizada se mantém constante mesmo após 20 dias, sugerimos que este comportamento não seja apenas em função de uma sensibilização das respostas defensivas provocada pela potencialização noradrenérgica.

Experimento 2 - Influência de modificações do protocolo de condicionamento de medo ao contexto na resposta de medo generalizada

Visto que o único parâmetro analisado para estudo da generalização é a porcentagem de congelamento no momento do teste B, tivemos a intenção de analisar e eliminar possíveis interferentes no protocolo que induz generalização. O protocolo padrão é realizado com a exposição ao contexto não-pareado (Teste B) na mesma sala do condicionamento (sala 1) e um dia após a sessão de evocação (Teste A). Para avaliar a influência das pistas relacionadas ao ambiente ao qual o animal é exposto à experiência aversiva para a expressão da resposta de medo generalizada, o teste B foi realizado em uma sala diferente da sala do condicionamento. Por outro lado, para avaliar a influência da sessão de evocação sobre a resposta de medo generalizada, esta sessão foi omitida do protocolo padrão. Ainda, a combinação destas variáveis também foi levada em conta. Desta forma, 98 animais foram alocados em oito grupos independentes ($n = 11-13/\text{grupo}$) com base no tratamento sistêmico com veículo ou ioimbina (2,0 mg/kg), com base na sessão de evocação (omitida ou não) e ainda com base na sala de realização do teste B (sala 1 ou sala 2). Como o objetivo deste experimento era o de avaliar apenas a resposta de medo generalizada (Teste B), para àqueles animais que passaram pela evocação (Teste A) este dado foi omitido.

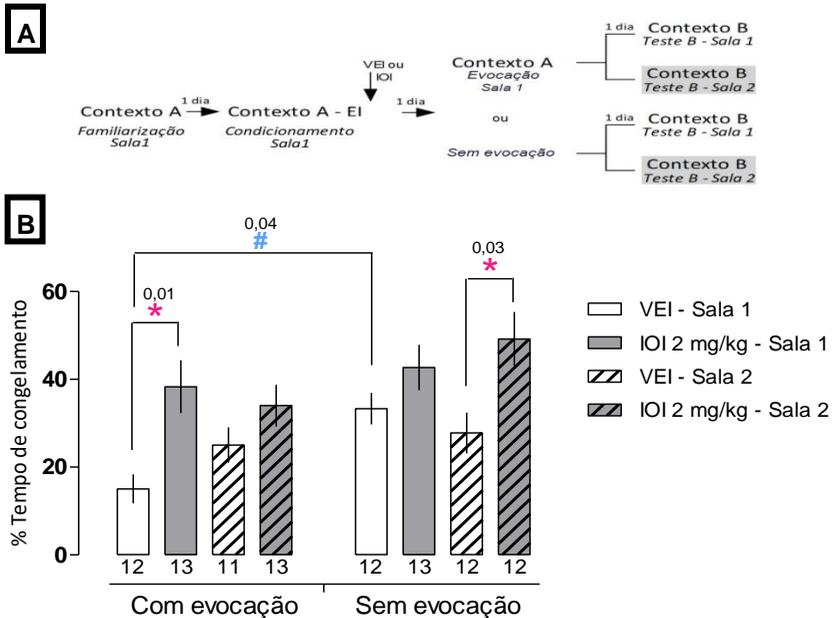


Figura 10 - Influência da evocação e sala de exposição ao teste B na resposta de medo generalizada provocada pela ioimbina. A - Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI 2,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após o condicionamento da memória de medo contextual. A seta indica o momento do tratamento. B - Resultados para os grupos levando em conta todas as modificações realizadas. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto não-pareado (Teste B). * = $p < 0,05$ entre IOI 2 mg/kg e VEI nas mesmas condições de evocação e # = $p < 0,05$ entre evocado e não evocado nas mesmas condições de tratamento e mesma sala (ANOVA fatorial seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls). O número na base das barras corresponde ao “n” de animais para cada grupo.

Em acordo com o experimento anterior, a ANOVA fatorial demonstrou um efeito significativo do tratamento com IOI 2,0 mg/kg sobre a resposta generalizada ($F_{1,90} = 20,93$, $P = 0,00002$). Ainda, evidenciou uma influência da sessão de evocação ($F_{1,90} = 8,6651$, $P = 0,004$) sobre a generalização. Com relação à sala de exposição ou à interação destes 3 fatores, a ANOVA não indicou diferenças. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que os animais tratados com 2,0 mg/kg de ioimbina apresentaram tempo de congelamento significativamente maior neste contexto não-pareado em relação aos animais tratados com veículo em duas situações da combinação

experimental: quando passaram por uma sessão de evocação prévia (Teste A) e foram testados para o Teste B na mesma sala (sala 1) – aqui chamado de protocolo padrão ($P = 0,01$); ou ainda na situação oposta, quando não passaram por uma sessão de evocação prévia (Teste A) e foram expostos ao contexto não-pareado em uma sala também nova (sala 2) – aqui chamado de protocolo modificado ($P = 0,03$). Como uma das características da resposta da generalização do medo é a expressão de comportamentos defensivos em condições diferentes da situação aversiva original, muitas vezes sem a reativação desta memória aversiva no contexto ou situação original, acredita-se que a situação do protocolo modificado seja a melhor aplicável ao nosso objetivo, de estudar a resposta de medo generalizada. Assim, a partir deste experimento, apenas o protocolo modificado foi utilizado para os experimentos seguintes.

Experimento 3 – Investigação da possível ocorrência de sensibilização das respostas defensivas provocada pela estimulação noradrenérgica com ioimbina

Como a estimulação noradrenérgica com a administração de IOI sempre se dá após o condicionamento, o qual por sua vez já provoca a liberação de hormônios de estresse, pode-se sugerir que o aumento no congelamento frente ao Contexto B tenha sido causado por uma sensibilização resultante do estresse provocado pelo choque somado à potencialização noradrenérgica pela IOI. Assim, para confirmar que o efeito da ioimbina sobre a generalização do medo é específico para a formação da memória aversiva mediante experiência associativa (pareamento do choque com o contexto somado à estimulação noradrenérgica), 15 ratos foram alocados em 2 grupos ($n = 7-8/\text{grupo}$), com base no tratamento sistêmico com veículo ou ioimbina (2,0 mg/kg) realizado logo após a sessão de condicionamento. Neste experimento, a sessão de condicionamento foi realizada com 3 choques imediatos, com intervalo de 30 s entre cada. Os animais não passaram por uma sessão de familiarização prévia, o que impede a formação de uma representação unitária do contexto e sua posterior associação com o estímulo aversivo.

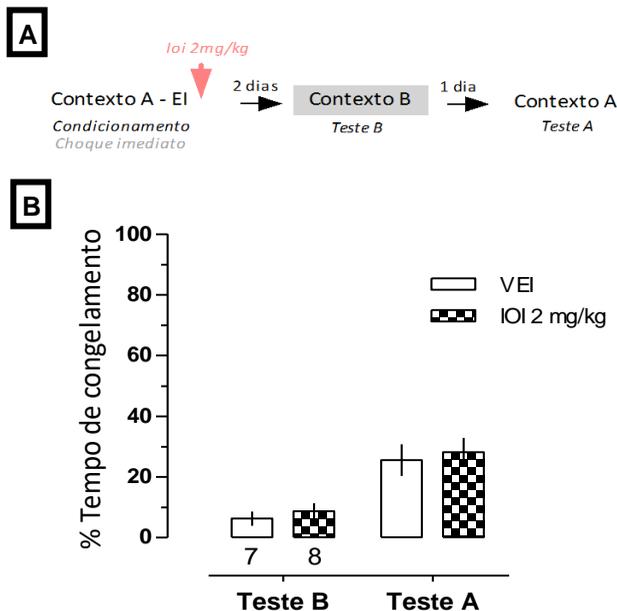


Figura 11. O efeito da ioimbina é específico para a formação da memória aversiva, quando esta é associada ao contexto. A- Veículo (VEI) ou ioimbina (2,0 mg/kg, i.p.) foram administrados logo após o condicionamento da memória de medo contextual. Os animais não passaram por uma sessão de familiarização prévia e a sessão de treino foi realizada com 3 choques imediatos. A seta indica o momento do tratamento. B - Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto não-pareado (Teste B) e ao contexto pareado (Teste A). Não houve qualquer diferença entre os grupos (teste “t” de Student para grupos independentes). O número na base das primeiras barras corresponde ao “n” de animais para cada grupo.

Neste protocolo, o teste “t” de Student demonstrou que não houve um efeito do tratamento tanto para o Teste A ($t_{13} = 1,09$, $P = 0,7$) quanto para o teste B ($t_{13} = 1,52$, $P = 0,5$). Com base nesses dados, podemos concluir que a resposta de medo generalizada no contexto não-pareado não se trata apenas de uma sensibilização das respostas defensivas e que o efeito da ioimbina depende da formação da memória aversiva, quando esta é associada ao contexto de condicionamento, o que é crucial para a sequência dos próximos experimentos.

Sessão 2 de dados – UTILIZANDO A RESPOSTA DE MEDO GENERALIZADA COMO FORMA DE INTERVENÇÃO NA MEMÓRIA ORIGINAL

Como já mencionado, a hipótese deste trabalho é de que a expressão de medo generalizado esteja relacionada à reativação da memória original no contexto não-pareado. A segunda sessão reúne experimentos cujo objetivo foi o de modular a memória traumática original através de manipulações farmacológicas com a resposta de medo generalizada.

O tratamento com IOI para indução da generalização foi um termo invariável para todos os grupos. Além disso, sendo que a memória formada com ioimbina é mais resistente a interferentes, conforme demonstrado por nosso laboratório previamente (GAZARINI et al., 2014), para alguns experimentos a possibilidade de manipulação farmacológica com D-cicloserina antes da exposição ao contexto B, a fim de favorecer a labilização (BUSTOS et al., 2010), foi considerada. A droga amnésica de escolha para os tratamentos farmacológicos após a exposição ao contexto não-pareado foi a clonidina.

Experimento 4 – Efeito de uma única administração de clonidina após exposição ao contexto não-pareado sobre a expressão de medo no contexto pareado e no contexto não-pareado - embasada no bloqueio de “reconsolidação”

O objetivo deste experimento foi avaliar alterações na expressão de medo no contexto pareado (resposta condicionada) partindo de manipulações farmacológicas após a exposição ao contexto não-pareado, uma vez que, quando induzida a generalização com a estimulação noradrenérgica com ioimbina, os animais expressam respostas defensivas também para este contexto. Para isso, 18 animais foram tratados com ioimbina (2 mg/kg via i.p.) após o condicionamento para indução da generalização do medo. 48 horas após, estes animais foram divididos em dois grupos (n = 9) com base no tratamento sistêmico com veículo ou clonidina (0,3 mg/kg) imediatamente após o Teste B, no intuito de prejudicar a re-estabilização desta memória generalizada. Após 24 horas, os animais foram testados no contexto A, quanto à resposta de medo condicionada (Figura 12A).

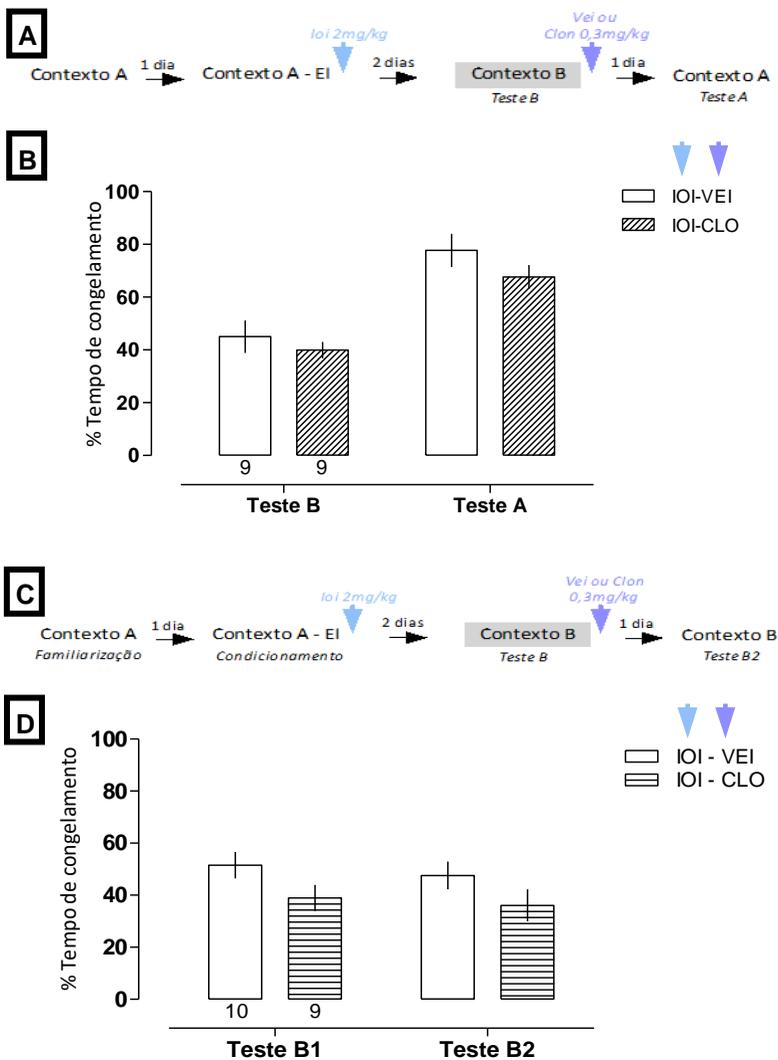


Figura 12. A administração de clonidina após expressão da resposta generalizada não altera a expressão de medo no contexto pareado (B), bem como não a altera no próprio contexto não-pareado (D). A e C- Ioimbina (2,0 mg/kg, i.p.) foi administrada logo após o condicionamento da memória de medo contextual. CLO ou VEI foram administrados imediatamente após o teste B. As setas indicam os momentos dos tratamentos. B e D - Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto não-pareado

(Teste B e Teste B2) ou ao contexto pareado (Teste A). Não houve diferença entre nenhum dos grupos analisados nestas condições (teste “t” de Student para grupos independentes ou ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls). O número na base das primeiras barras corresponde ao “n” de animais para cada grupo.

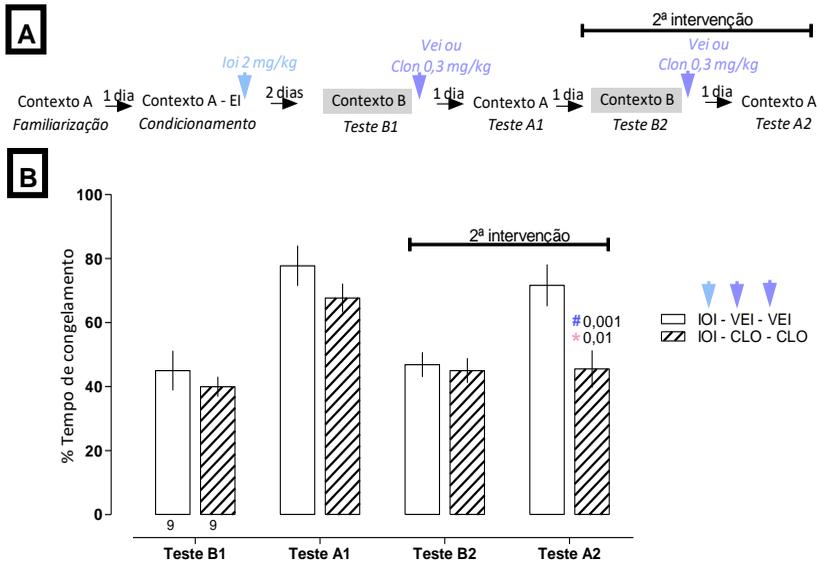
O teste “t” de Student não revelou efeito significativo para o tratamento com clonidina sobre o tempo de congelamento no contexto A ($t_{16} = 1,96$, $P = 0,2$), indicando que essa manipulação farmacológica após uma exposição ao contexto não-pareado não foi capaz de interferir com a “re-estabilização” da memória, não alterando assim a expressão de medo no contexto pareado (contexto A), conforme observado na figura 12B.

O mesmo experimento foi realizado com outros 19 animais, também divididos em dois grupos ($n = 9-10$) com base no tratamento sistêmico com veículo ou clonidina (0,3 mg/kg) imediatamente após o Teste B, da mesma forma previamente descrita. Porém, desta vez, após 24 horas, os animais foram testados no próprio contexto B (figura 12C), a fim de avaliar alterações na expressão generalizada de medo. Da mesma forma, a ANOVA de uma via com medidas repetidas não revelou efeito significativo tanto para o tratamento com clonidina sobre o tempo de congelamento no contexto B ($F_{1,17} = 3,42$, $P = 0,08$), quanto para a repetição ($F_{1,17} = 0,72$, $P = 0,4$), indicando que a manipulação farmacológica com clonidina após a exposição ao contexto não-pareado também não foi capaz de interferir com a expressão da memória generalizada, conforme observado na figura 12D. Estes dados preliminares parecem indicar que a expressão de medo no contexto não-pareado pode não estar relacionada à evocação da memória original, pelo menos não nesta condição experimental analisada.

Experimento 5 - Influência da re-exposição ao contexto não-pareado sobre o efeito amnésico da clonidina

A administração de clonidina após uma única exposição ao contexto não-pareado não foi capaz de provocar diferenças significativas na expressão de medo no contexto pareado. Ainda assim, não exclui a possibilidade de que a memória original seja “evocada” no contexto não-pareado. Talvez uma única sessão de “evocação” não seja suficiente para evidenciar os efeitos amnésicos da clonidina. Esta questão foi cogitada baseada em trabalhos da literatura que demonstraram, mediante

duas administrações de clonidina pós-reativação prejudicar de forma máxima a retenção da memória aversiva após sua evocação (GAMACHE, PITMAN, NADER, 2012). A fim de investigar esta questão, os mesmos 18 animais do experimento 4A foram, então, expostos novamente ao contexto não-pareado (agora B2), um dia após o teste A1. Esta exposição foi imediatamente seguida de mais uma administração de clonidina 0,3 mg/kg e, no dia seguinte, os animais foram testados em A2.



13. O efeito amnésico da clonidina sobre a memória original é evidente após duas exposições sucessivas ao contexto não-pareado. A - Ioimbina (2,0 mg/kg, i.p.) foi administrada logo após o condicionamento da memória de medo contextual. CLO ou VEI foram administrados imediatamente após o teste B1 e teste B2. As setas indicam os momentos dos tratamentos. B - Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A1 e A2) e ao contexto não-pareado (Teste B1 e B2). * = $p < 0,05$ entre os grupos na mesma sessão de teste e # = $p < 0,05$ entre as sessões de teste para o mesmo grupo (ANOVA com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls). O número na base das primeiras barras corresponde ao “n” de animais para cada grupo.

De modo interessante, para o teste A, a ANOVA de uma via com medidas repetidas indicou diferenças significativas entre os grupos para os fatores tratamento ($F_{1,16} = 6,27$, $P = 0,02$) e re-exposição nas sessões de teste A1 e A2 ($F_{1,16} = 0,27$, $P = 0,003$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou uma redução no tempo de congelamento do grupo tratado com clonidina após duas exposições no contexto não-pareado, em relação ao grupo controle na sessão de Teste A2 ($P = 0,01$) e em relação à sessão anterior (Teste A1) ($P = 0,001$). Ou seja, após duas exposições ao contexto não-pareado, seguidas da administração de clonidina, foi possível observar o prejuízo causado por esta droga amnésica sobre a resposta de medo condicionada, indicando que a manipulação farmacológica após a exposição ao contexto não-pareado pode alterar o traço original da memória, pelo menos de forma parcial, para esta condição analisada.

Experimento 6 - Efeito da facilitação da labilização sobre a ação da clonidina no contexto não-pareado

Uma possível explicação para os dados anteriores é de que provavelmente apenas uma exposição ao contexto não-pareado não seja suficiente para labilizar esta memória, visto que já foi demonstrado que uma memória aversiva muito robusta apresenta como característica, além da generalização (GAZARINI et al., 2014), uma certa resistência à labilização (BUSTOS et al., 2010; GAZARINI et al., 2014). Para testar esta hipótese, neste experimento duas estratégias para facilitar a labilização desta memória foram consideradas: aumento do tempo de exposição ao contexto não-pareado, na sessão de teste B (figura 14A), e a administração prévia de D-cicloserina para facilitação farmacológica da labilização no momento do teste B (figura 14C).

Em relação à primeira abordagem, 19 animais receberam pré-tratamento com ioimbina (2 mg/kg via i.p.) após o condicionamento para indução da generalização do medo. No dia seguinte, os animais foram submetidos à sessão de Teste B com duração de 5 minutos. Estes animais foram, então, divididos em dois grupos ($n = 9-10$) com base no tratamento sistêmico com veículo ou clonidina (0,3 mg/kg) imediatamente após o Teste B, para prejudicar a re-estabilização desta memória. Após 24 horas, os animais foram testados no contexto A, quanto à memória aversiva original. O teste “t” de Student não revelou diferenças significativas na sessão de Teste A para o fator tratamento ($t_{17} = 1,82$, $P = 0,09$), ou seja, o aumento no tempo de “reativação” de

forma isolada não foi capaz de evidenciar os efeitos da clonidina sobre a memória original (figura 14B). Além disso, não houve qualquer alteração sobre a expressão da memória generalizada, provavelmente pela dificuldade de labilização desta memória.

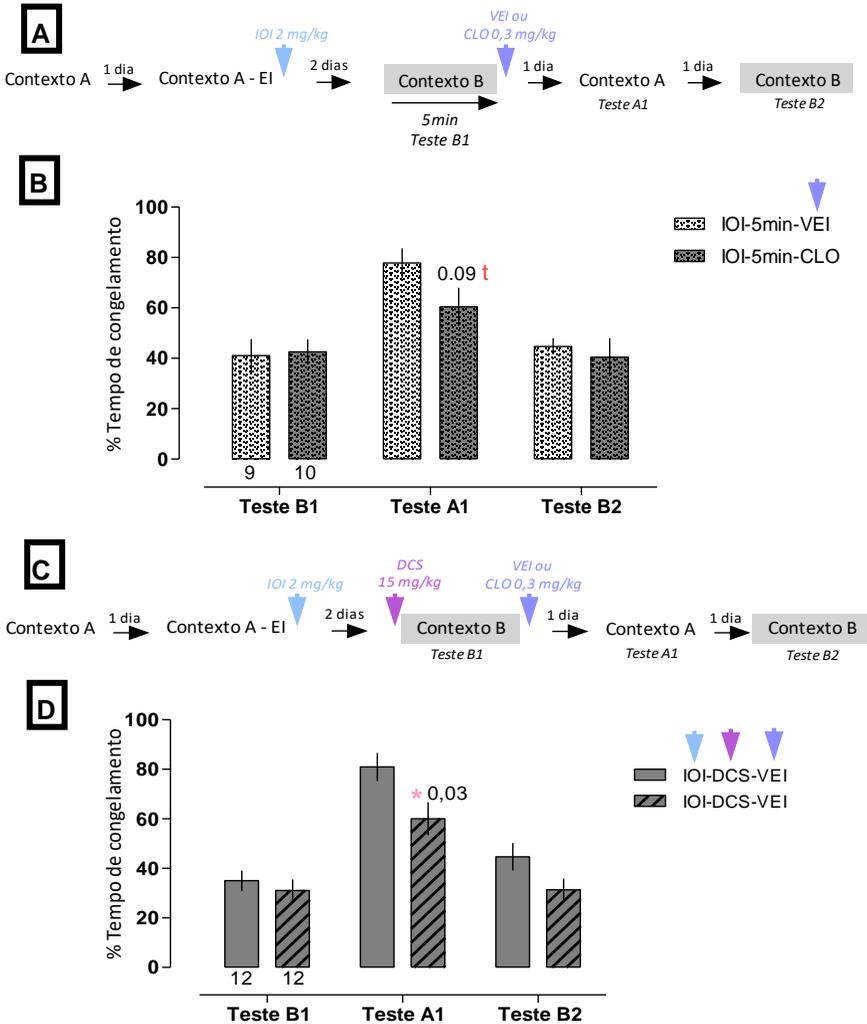


Figura 14. A facilitação da labilização por administração prévia de D-cicloserina foi mais efetiva em evidenciar o efeito amnésico da clonidina que o

aumento do tempo de exposição ao contexto não-pareado. Ioimbina (2,0 mg/kg, i.p.) foi administrada logo após o condicionamento da memória de medo contextual. CLO ou VEI foram administrados imediatamente após o teste B1. As setas indicam os momentos dos tratamentos. A – a sessão de teste B1 teve duração de 5 minutos; C – previamente ao teste B1 os animais receberam a administração de D-cicloserina (15 mg/kg i.p). B e D - Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) e ao contexto não-pareado (Teste B1 e B2). * = $p < 0,05$ entre os grupos na mesma sessão de teste (teste “t” de Student para grupos independentes). O número na base das primeiras barras corresponde ao “n” de animais para cada grupo.

Por outro lado, para facilitação farmacológica da labilização, o mesmo protocolo descrito acima foi realizado com outros 24 animais ($n = 12$), com a diferença que todos os animais receberam uma administração de D-cicloserina 15 mg/kg via i.p. 30 minutos antes da sessão de Teste B, que teve duração de 3 minutos. Neste caso, O teste “t” de Student revelou diferenças significativas na sessão de Teste A para o fator tratamento ($t_{22} = 1,34$, $P = 0,03$), ou seja, o efeito amnésico da clonidina sobre a memória original foi evidenciado após administração prévia de D-cicloserina para facilitação farmacológica de labilização (figura 14D).

Experimento 7 - Efeito de intervenções farmacológicas após a expressão generalizada de medo sobre a resistência da memória aversiva original à ação amnésica da clonidina no contexto pareado

Até este momento, os experimentos foram realizados com o intuito de provocar uma redução na expressão de medo no contexto pareado (Teste A) após manipulações farmacológicas no contexto não-pareado (Teste B), o que não foi possível em todos os casos. Isso provavelmente ocorreu pelo fato de a memória potencializada com ioimbina ser mais resistente à ação amnésica da clonidina (GAZARINI et al., 2014). Este experimento teve o intuito de avaliar os possíveis efeitos da manipulação da resposta de medo generalizado sobre resistência da memória original à ação amnésica da clonidina. Para isso, 38 animais receberam IOI após o condicionamento e foram divididos em 4 grupos com base no tratamento prévio com D-cicloserina ou veículo e no tratamento imediatamente após o contexto não-pareado (Teste B1) com clonidina ou veículo. Todos os grupos receberam clonidina imediatamente após o teste A1.

Para o teste A, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas indicou diferenças significativas entre os grupos para os fatores tratamento ($F_{1, 34} = 5,80$ $P = 0,02$) e re-exposição nas sessões de teste A1 e A2 ($F_{1, 34} = 12,81$ $P = 0,001$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou uma redução na resposta condicionada do grupo D-cicloserina + clonidina em relação ao grupo controle na sessão de Teste A2 ($P = 0,01$) e em relação à sessão anterior (Teste A1) ($P = 0,0003$). Ou seja, o bloqueio de “reconsolidação” combinado à facilitação da labilização no contexto não-pareado torna memória original mais susceptível à intervenção farmacológica, após reativação no contexto pareado.

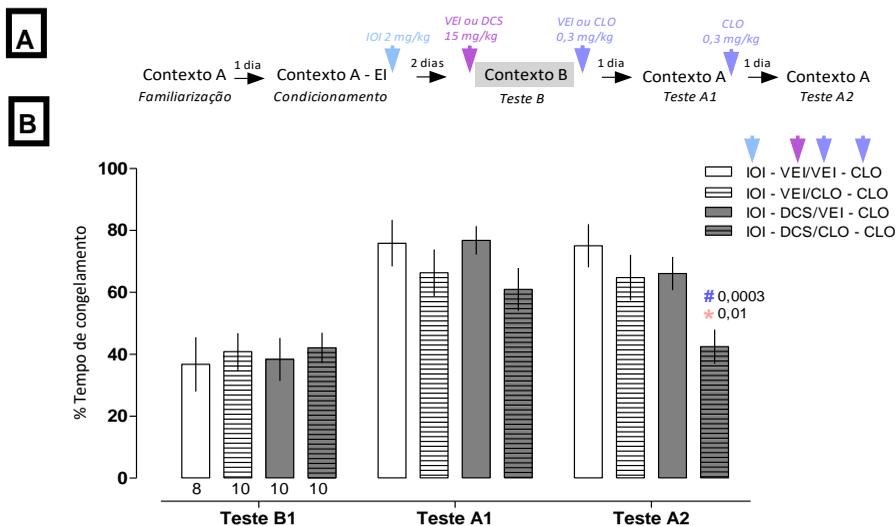


Figura 15. O bloqueio da reconsolidação combinado à facilitação da labilização no contexto não-pareado torna a memória original mais susceptível à intervenção farmacológica, frente à evocação no contexto pareado. A - Ioimbina (2,0 mg/kg, i.p.) foi administrada logo após o condicionamento da memória de medo contextual. 30 minutos antes do teste B1 os animais receberam a administração de VEI ou DCS (15 mg/kg i.p) e imediatamente após o mesmo teste, os animais receberam a administração de VEI ou CLO. Após o teste A1 todos os animais recebem clonidina. As setas indicam os momentos dos tratamentos. B - Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) e ao contexto não-pareado (Teste B). * = $p < 0,05$ entre os grupos na mesma sessão de teste e # = $p < 0,05$ entre as sessões de teste para o mesmo grupo (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). O número na base das primeiras barras corresponde ao “n” de animais para cada grupo.

Estes dados sugerem que a facilitação de labilização por D-cicloserina combinada à administração de clonidina no contexto não-pareado é capaz de resgatar a flexibilidade (capacidade de labilização) de uma memória potencializada por ioimbina frente ao contexto pareado. Ou seja, podemos interferir com o traço original da memória a partir de um contexto dissociado do evento aversivo original, mesmo quando não há alteração na resposta comportamental expressa.

Experimento 8 - Envolvimento do hipocampo como sítio de labilização necessário para a modulação da resposta de medo condicionada, partindo de intervenções farmacológicas após a expressão generalizada de medo

Sabendo da importância do hipocampo para a formação e evocação de uma memória contextual (HOLLAND e BOUTON, 1999; FANSELOW, 2000), seria importante tentar relacionar o papel dessa estrutura no possível mecanismo de intervenção com a memória original a partir da expressão generalizada de medo (baseado no bloqueio de “reconsolidação” com destaque para o envolvimento da labilização) proposto neste trabalho. Para tal, este experimento teve como objetivo confirmar que, de fato, os resultados anteriores sejam devidos a uma facilitação da labilização da memória original, após as manipulações farmacológicas com a expressão generalizada de medo. Assim, 21 animais receberam IOI após o condicionamento, foram tratados com D-cicloserina anteriormente ao teste B1 e com clonidina imediatamente após. Um dia após, no Teste A1, os animais foram divididos em 2 grupos com base no pré-tratamento (15 minutos antes) com ifenprodil ou veículo, por infusão central diretamente sobre o hipocampo dorsal, com o intuito de prevenir a desestabilização e labilização da memória e assim avaliar se o efeito da clonidina, observado anteriormente, é impedido. Todos os grupos receberam clonidina imediatamente após o teste A1.

Para o teste A, a ANOVA de medidas repetidas indicou apenas uma tendência entre os grupos para o tratamento com ifenprodil ($F_{1,19} = 3,4957$, $P = 0,08$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou também uma tendência de prevenção dos efeitos amnésicos da clonidina na sessão de Teste A2 ($P = 0,09$) em relação ao grupo controle, que não recebeu ifenprodil. Para o teste B, ANOVA de duas vias indicou apenas uma tendência em relação à re-exposição para o grupo VEI ($F_{1,19} =$

3,2976, $P = 0,08$). O mesmo não foi observado para o grupo tratado com ifenprodil. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou a manutenção da resposta generalizada para o grupo tratado com ifenprodil em relação ao grupo controle, visto que este último apresenta uma queda do comportamento de medo entre a sessão B1 e B2 ($P = 0,05$). Ou seja, o tratamento prévio com ifenprodil no hipocampo dorsal bloqueia parcialmente os efeitos da clonidina após reativação no contexto pareado (observado no experimento anterior), inclusive sobre a própria resposta de medo generalizada.

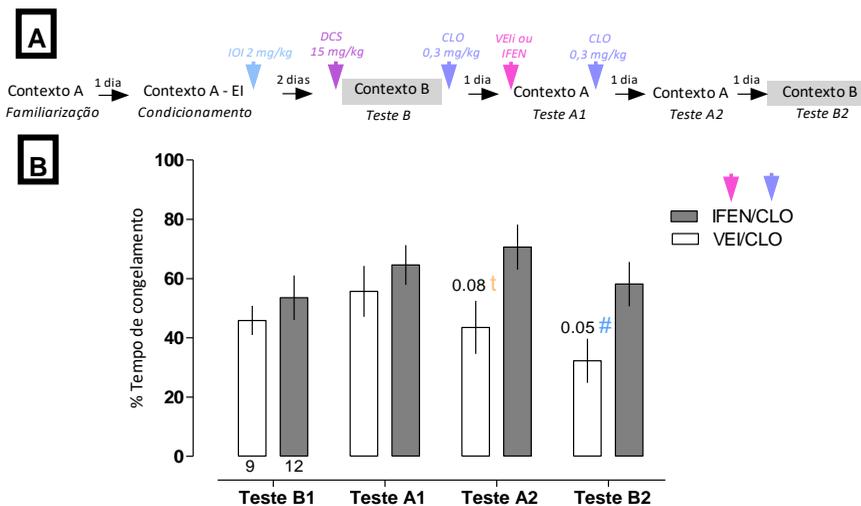


Figura 16. O hipocampo parece ser um sítio importante de labilização necessário para os efeitos do bloqueio da reconsolidação da memória generalizada sobre a memória original. A - Ioimbina (2,0 mg/kg, i.p.) foi administrada logo após o condicionamento da memória de medo contextual (3 x 0,8 mA para animais operados). 30 minutos antes do teste B1 todos os animais receberam a administração de D-cicloserina (i.p) e imediatamente após o mesmo teste, os animais receberam a administração de CLO. Anteriormente (15min) ao teste A1 os animais receberam administração intra-hipocampal de vei ou ifenprodil e imediatamente após todos os animais receberam a administração de clonidina. As setas indicam os momentos dos tratamentos. B - Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) e ao contexto não-pareado (Teste B). #: $P = 0,05$ entre as sessões de teste para o mesmo grupo e t indica uma tendência para efeito entre os grupos para a mesma sessão de teste (ANOVA com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). O número na base das primeiras barras corresponde ao “n” de animais para cada grupo.

Estes dados indicam que os efeitos observados estão relacionados, pelo menos em parte, à alteração do perfil de labilização da memória potencializada e que o hipocampo dorsal pode ser um sítio de grande interesse para investigações futuras.

DISCUSSÃO

5.1 A generalização de respostas defensivas por estimulação farmacológica: as bases da pesquisa

5.1.1 O fenômeno da “generalização de medo”

Tratamos do termo “generalização” das respostas defensivas uma vez que, no protocolo utilizado, os animais do grupo tratado com ioimbina expressaram significativamente maior tempo de congelamento que os animais do grupo veículo. Contudo, os primeiros não atingem níveis de congelamento no contexto não-pareado comparáveis ao contexto pareado. A expressão generalizada de medo só foi observada quando a estimulação noradrenérgica foi feita após um treino de condicionamento contextual que induz, por si só, níveis elevados de congelamento em um teste posterior (cerca de 80%) (GAZARINI et al., 2014). Resultados semelhantes já haviam sido observados para a administração sistêmica de corticosterona (KAOUANE et al., 2012). Vale destacar que os protocolos de condicionamento utilizados, tanto o padrão quanto o modificado, não são capazes de induzir a generalização *per se*, conforme observado para os grupos VEI nos experimentos 1, 2 e 3. Portanto, sugere-se que a generalização observada, após administração de IOI, provavelmente é decorrente de efeito potencializador desta droga sobre a consolidação da memória, em acordo com trabalhos prévios que demonstraram que a potencialização do aprendizado aversivo resulta na expressão generalizada de respostas defensivas (BALDI, LORENZINI, BUCHERELLI, 2004; GAZARINI et al., 2013; 2014; GHOSH e CHATTARJI, 2015). Dados não publicados do nosso laboratório (GAZARINI, 2015) demonstraram que a administração de IOI, capaz de induzir generalização do medo, promove aumento significativo na expressão de Arc (do inglês, ‘*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*’) na região CA1 do hipocampo. Esta proteína apresenta função estrutural e expressão imediata frente a eventos que levam à plasticidade neuronal (KORB e FINKBEINER, 2011), como ocorre para a formação de memórias (TZINGOUNIS e NICOLL, 2006). Esta expressão aumentada de Arc no HD reforça ainda mais a idéia de que a formação de uma memória mais intensa/robusta aumenta a possibilidade para a ocorrência de generalização do medo.

Tem se questionado a respeito do fenômeno neuronal responsável pela transição entre a expressão específica de medo para a generalizada. É discutida a possibilidade de que estes animais submetidos a uma potencialização da consolidação tenham um arranjo diferencial do traço da memória, o que poderia ser decorrente de uma mudança no circuito neuronal responsável pela formação da memória de medo e, conseqüentemente, de um processamento diferencial desta (CHA et al., 2014; ROZESKE et al., 2015). Ghosh e Chattarji (2015) demonstraram, por meio de um protocolo de condicionamento mais intenso, que a generalização de medo se correlacionou com um recrutamento adicional, mas também diferencial, de neurônios da amígdala basolateral que seriam ativados frente a uma pista nova, não associada com a experiência aversiva original.

Fundamentalmente, é muito comum autores discutirem a generalização como uma dificuldade de discriminação de informações contextuais no momento da evocação destas memórias (OLSON, 2011), no entanto, já se sabe que, em algumas situações, a generalização acontece mesmo frente a estímulos que poderiam ser facilmente distinguidos (DUNSMOOR, MITROFF, LABAR, 2009).

Outra interpretação seria a possibilidade de evocação da memória aversiva por meio de pistas não diretamente associadas ao evento aversivo inicial, mas que remetam de alguma forma ao estado interno relacionado àquela experiência (ATON, 2013). O estado interno representa o significado emocional induzido por um estímulo particular ao ser experimentado e orienta as decisões comportamentais que afetam a sobrevivência (CRAIG, 2009). Desta forma, a apresentação de um estímulo que não faça, necessariamente, parte da informação armazenada, mas refira-se ao estado emocional interno poderia induzir a expressão comportamental relacionada. O estado interno pode ser alterado por qualquer estímulo externo (manipulações ambientais ou farmacológicas) ou fatores internos (neuromoduladores) e seria o principal responsável por determinar como os neurônios e circuitos neuronais respondem a um determinado estímulo sensorial, tanto na forma que a informação sensorial é recebida (forma que os neurônios respondem a estímulos sensoriais) quanto ao longo do tempo, alterando a plasticidade neuronal (ATON, 2013).

5.1.2 Uso da ioimbina como ferramenta farmacológica:

A administração de IOI após o condicionamento no Contexto A provocou um aumento significativo na expressão de congelamento frente a um contexto não-pareado (B), quando comparada à administração de VEI, característica da generalização das respostas defensivas. Este resultado concorda com dados da literatura, visto que diversos trabalhos associam este fenômeno com uma ativação excessiva do sistema noradrenérgico (PITMAN, 1989; YEHUDA, MCFARLANE, SHALEV, 1998; O'DONNELL, HEGADOREN, COUPLAND, 2004; SOETER e KINDT, 2012). A IOI, mediante antagonismo do autoreceptor de noradrenalina, subtipo α_2 (IVANOV e ASTON-JONES, 1995), controla a liberação de noradrenalina pelo *locus coeruleus* para o sistema nervoso central. O aumento da concentração de noradrenalina e, por sua vez, consequente ativação aumentada de receptores β -adrenérgicos, promovem a facilitação da transmissão sináptica através de mecanismos que envolvem aumento na concentração de AMPc e síntese de novas proteínas (MCGAUGH e ROOZENDAAL, 2002), resultando em uma potencialização da consolidação da memória (TULLY e BOLSHAKOV, 2010).

Com relação ao perfil temporal do efeito da IOI, foi observado que os animais tratados com IOI 2 mg/kg continuaram expressando níveis de congelamento no teste A2, 21 dias após o condicionamento, comparáveis ao teste A1. Assim, além da indução de generalização, podemos sugerir um efeito da IOI, sobre a persistência da memória ao longo do tempo. Outros trabalhos também destacam que memórias traumáticas apresentam uma característica mais duradoura (PITMAN, 1989; ELZINGA e BREMNER, 2002; ZOLADZ e DIAMOND, 2013; GAZARINI et al., 2014). O mesmo não foi observado para os animais do grupo VEI, correspondendo provavelmente a um esquecimento gradual que acontece em memórias não reforçadas e não reativadas com o passar do tempo (GAMACHE, PITMAN, NADER, 2012), como foi o caso deste grupo.

Autores destacam o potencial ansiogênico da IOI, sendo demonstrada por aumentar comportamentos tipo-ansiosos e de intensificar respostas defensivas frente a outros testes comportamentais (ZHENG e RINAMAN, 2013). Gazarini e colaboradores (2014) demonstraram em seu trabalho que a ioimbina não apresenta efeito *per se* sobre a expressão de medo no contexto pareado, ou seja, que esta droga não atua como estímulo incondicionado na ausência dos choques. No presente trabalho, confirmou-se também, através do experimento 3,

que a generalização observada não é resultado apenas de uma sensibilização das respostas defensivas provocada pela experiência aversiva intensa somada a potencialização noradrenérgica. Ainda através deste experimento, podemos sugerir que efeito da ioimbina é dependente da formação da memória aversiva mediante experiência associativa (pareamento do choque com o contexto somado à estimulação noradrenérgica), visto que a administração de IOI não apresentou efeito sobre a resposta de congelamento quando os animais foram submetidos ao protocolo de “*déficit de choque imediato*”. A ausência da sessão de familiarização ou de um pequeno tempo de contextualização pré-choque, protocolo chamado de “*déficit de choque imediato*”, não possibilita a formação de uma representação unitária do contexto (FANSELOW, 1990; LANDEIRA-FERNÁNDEZ et al., 2006), o que seria crucial para a associação do estímulo incondicionado e formação completa da memória contextual (MCLAREN, KAYE, MACKINTOSH, 1989; CHANG e LIANG, 2016). Além disso, se considerarmos que a meia-vida da IOI é de 0,15/0,5h (SWAN et al., 2005) e que sua concentração no cérebro de ratos não persiste por mais de 8h (HUBBARD et al., 1988), dificilmente poderíamos atribuir qualquer alteração comportamental a um efeito residual ansiogênico ou de sensibilização por ação desta droga no momento dos testes (24h ou mais após a administração).

5.1.3 Adequações metodológicas

Este trabalho requereu algumas adequações metodológicas ao passo de sua execução. Com relação à dose de IOI, por exemplo, Gazarini e colaboradores (2014) haviam demonstrado a potencialização da memória e expressão de resposta generalizada de medo com o emprego de uma dose de 1,0 mg/kg de ioimbina. Porém, neste estudo, conforme o decorrer dos experimentos se fez necessário um ajuste de dose (2 mg/kg) a fim de atingir níveis estáveis e reprodutíveis de congelamento no contexto não-pareado, para o protocolo em questão.

Com relação ao protocolo de condicionamento empregado, nos questionamos quanto à influência de uma sessão de evocação (no contexto pareado) e da alteração da sala de realização do teste B sobre a expressão da resposta de medo generalizada. De forma geral, conforme observado no experimento 2, as diferenças entre os protocolos foram mais evidentes para os animais do grupo controle, isso porque seria possível acessar e desestabilizar a memória mediante reativação

(LEWIS, 1979). Por outro lado, como já discutimos anteriormente, memórias reforçadas seriam menos passíveis de desestabilizar frente à evocação (SUZUKI et al., 2004; BUSTOS et al., 2010; SOETER e KINDT, 2013; GAZARINI et al., 2014; VANVOSSSEN et al., 2017), assim fica claro o porquê dos grupos tratados com IOI apresentarem menor variação entre os protocolos.

Quando foi alterada apenas a sala de realização do Teste B, mantendo-se a sessão de evocação prévia, não houve diferença na resposta de medo generalizada entre o grupo controle e IOI. Isto porque os controles parecem apresentar maior tempo de congelamento neste paradigma. Podemos interpretar que quando a exposição ao contexto não-pareado se dá em uma sala também nova, a representação contextual global possui caráter diferenciado do que quando o teste B é realizado na mesma sala do condicionamento, isso por que o fator “novidade” poderia atrapalhar, ainda que parcialmente, a interpretação contextual. Huckberry e colaboradores também demonstraram que a generalização do medo para pistas contextuais é sensível a pequenas variações de procedimento, por meio de diferentes paradigmas nos quais comparam a contribuição relativa de características contextuais específicas (HUCKLEBERRY, FERGUSON, DREW, 2016).

Quando a sessão de evocação prévia foi omitida, porém, desta vez, sem alteração da sala de realização do Teste B, de forma semelhante não houve diferença na porcentagem de resposta de medo generalizada entre o grupo controle e o IOI, também porque os controles parecem apresentar maior tempo de congelamento neste protocolo. Huckberry e colaboradores demonstraram que a ordem do teste (teste B antes ou após o Teste A) pode ter um efeito significativo na generalização do contexto, muito embora não atribuam um mecanismo para tal dado (HUCKLEBERRY, FERGUSON, DREW, 2016). Autores destacam o papel da evocação na manutenção da precisão das memórias ao longo do tempo, sendo responsável por possibilitar um maior detalhamento contextual (DUDAI, 2002). Podemos sugerir que a sessão de evocação interfira na expressão de medo através da representação contextual formada, por permitir a integração ou atualização de componentes do contexto em questão.

Por fim, através do “protocolo modificado”, quando foi alterada a sala de realização do Teste B e a sessão de evocação prévia foi omitida, os animais do grupo IOI expressaram significativamente maior porcentagem de medo generalizado do que o grupo controle. Sugerimos como interpretação os mesmos pontos já discutidos anteriormente. Acreditamos que esta situação seja a melhor aplicável ao nosso objetivo,

já que uma das características da generalização do medo é a expressão de comportamentos defensivos em condições diferentes da situação aversiva original (WHALLEY, 2015), incontestavelmente na maioria das vezes, sem o retorno ao contexto original para evocação da memória.

5.2 Modulação da memória aversiva original a partir da resposta generalizada de medo

Optamos partir de estratégias baseadas no “bloqueio de reconsolidação” por sua validade em diversos modelos pré-clínicos e clínicos (MISANIN et al, 1968; MACTUTUS et al, 1979; PRZYBYSLAWSKI; SARA, 1997; SARA, 2000; NADER, SCHAFE, LEDOUX, 2000). A hipótese de reconsolidação postula que a evocação da memória, mediante a apresentação de pistas previamente associadas, pode induzir uma fase lábil adicional durante a qual a memória é susceptível a interferentes (MISANIN, MILLER, LEWIS, 1968; LEWIS, 1979). Nesse contexto e considerando que o fenômeno de generalização é uma consequência da experiência aversiva inicial, sugere-se que a exposição ao contexto não associado (Contexto B) poderia induzir um estado transitório durante o qual a memória original seria passível de modificação. Assim, a administração de drogas amnésicas nesta fase poderia atenuar o impacto exacerbado da memória traumática.

5.2.1 Clonidina e seu efeito amnésico

O papel negativo de receptores α_2 -adrenoceptores na modulação da função cognitiva já é descrita na literatura (GALEOTTI, BARTOLINI, GHELARDINI, 2004). Quanto ao efeito amnésico da clonidina, já foi demonstrado que a dose de 0,1 mg/kg foi capaz de induzir prejuízos na tarefa de esQUIVA passiva (GALEOTTI, BARTOLINI, GHELARDINI, 2004). Gazarini e colaboradores (2014) demonstraram que a ativação de receptores α_2 -adrenérgicos com clonidina prejudicou tanto a consolidação quanto a reconsolidação de uma memória de medo contextual, na mesma dose empregada no presente trabalho. Apesar de se tratar de uma dose mais alta que a comumente empregada em testes comportamentais (MONDACA et al., 2004) por apresentar efeitos sedativos e motores pronunciados (MACMILLAN et al., 1996), a curta meia-vida desta droga, de 30-120min (CONWAY e JARROTT, 1982), exclui a possibilidade desta interferência no momento do teste, 24 horas após sua administração. Além disso, não podem ser atribuídos efeitos antiaversivos ou locomotores residuais já que resultados prévios do nosso laboratório demonstraram que não houve qualquer alteração no labirinto em cruz

elevado para esta dose testada no mesmo momento do Teste B (GAZARINI et al., 2013).

A clonidina é comprovada por prejudicar a retenção da memória através do bloqueio de reconsolidação (GOZZANI e IZQUIERDO, 1976; GAMACHE, PITMAN, NADER, 2012; GAZARINI et al. 2014), provavelmente por sua capacidade de reduzir a estimulação do *locus coeruleus*, a atividade noradrenérgica central e a indução/manutenção da LTP (ABERCROMBIE, KELLER, ZIGMOND, 1988; RASMUSSEN e JACOBS, 1988; DEBOCK et al., 2003; MONDACA et al., 2004; LI et al., 2013). Contudo, conforme observado no experimento 4, a administração de clonidina após uma única exposição ao contexto não-pareado não foi capaz de provocar diferenças significativas na expressão de medo no contexto pareado. De forma importante, o efeito da clonidina é dependente da evocação que leva à desestabilização da memória e na ausência desta condição, não há efeitos amnésicos (GAMACHE, PITMAN, NADER, 2012). Visto que a manipulação farmacológica foi dada após exposição a um contexto não pareado, podemos sugerir que esta condição não tenha sido suficiente para desestabilizar a memória.

Por outro lado, quando foram realizadas duas exposições ao contexto B seguidas da administração de clonidina (experimento 5) houve um prejuízo na memória original. Um trabalho recente demonstrou que o bloqueio da reconsolidação por clonidina foi observado após um tratamento com a dose de 0,1 mg/kg e atingiu o seu o efeito máximo após dois tratamentos (GAMACHE, PITMAN, NADER, 2012). Outro experimento com até três reativações poderia ser realizado para subsidiar esse perfil de ação da clonidina e confrontar tais dados da literatura. Uma questão importante a se destacar neste ponto da discussão é o cuidado na quantidade de exposições e a possibilidade de ocorrência de extinção (BOUTON, 2002), visto que o número de exposições e o tempo de exposição ao contexto podem favorecer a formação de uma memória de extinção. Acreditamos que esta possibilidade seja mais improvável visto que tratamos de um contexto diferente e após todas as exposições houve administração de droga amnésica, o que se fosse o caso, prejudicaria a formação da memória de extinção (ALMEIDA-CORRÊA e AMARAL, 2014).

Além da intervenção direta com a expressão da resposta condicionada, no experimento 7 foi possível observar que a manipulação farmacológica no contexto não-pareado alterou a resistência da memória original, ou seja, a memória potencializada pela IOI, outrora inacessível, tornou-se passível à ação amnésica da clonidina

no contexto pareado. Estes dados em conjunto com os do experimento 5 sugerem que, ainda que não possam ser precisados tais mecanismos, de alguma forma esta memória pode ser evocada e reativada, mesmo que parcialmente, no contexto B. Recentemente, Chang e Liang (2016) sugeriram que uma memória aversiva pode ser reativada por estímulos não contidos no evento original desde que compartilhem elementos comuns àquele, demonstrando a participação de mecanismos de *pattern completion* hipocampais relacionados à expressão de respostas de medo em um contexto novo.

Muito há para se estudar e investigar no que diz respeito ao mecanismo relacionado aos efeitos observados no presente estudo. Presumidamente, os efeitos da clonidina descritos no presente estudo poderiam seguir mecanismos bem próximos aos descritos para o bloqueio de reconsolidação (FINNIE e NADER, 2012; KINDT, SOETER, SEVENSTER, 2014). Contudo, na ausência de técnicas moleculares mais aprimoradas, não podemos afirmar que haja um prejuízo de reconsolidação propriamente dito, mas podemos sugerir que os dados apresentados poderiam representar um sistema de enfraquecimento sináptico capaz de causar este “*mismatch*” entre a memória original e a informação disponível no momento (ALMEIDA-CORRÊA e AMARAL, 2014).

5.2.2 Labilização como mecanismo chave: importância e envolvimento do hipocampo

Soeter e Kindt (2013) demonstraram em humanos propensos a desenvolver ansiedade que uma única reativação não reforçada foi insuficiente para uma destabilização plena e ótima do traço de memória, o que corrobora com os dados do nosso experimento 4. Podemos sugerir que neste caso, por se tratar de uma memória reforçada e sua “evocação” ter sido realizada em um contexto não pareado ao evento aversivo, seja muito difícil acessar e desestabilizar o traço de memória com apenas uma sessão de reativação. Como mencionado na introdução, existem condições capazes de prevenir a ocorrência da reconsolidação, tal qual acontece para memórias reforçadas (SUZUKI et al, 2004; FORCATO et al., 2007; WANG et al., 2009; SOETER M, KINDT M. 2013). Um exemplo disso foi demonstrado por Gazarini et al. (2014), onde o reforço no condicionamento provocado pela ioimbina torna a memória menos susceptível à ação de agentes amnésicos. Outros

trabalhos já demonstram resultados semelhantes em protocolos que envolviam estresse prévio (BUSTOS et al. 2010; ESPEJO et al., 2016).

Considerando a possibilidade de que haja uma dificuldade de labilização no momento do teste B, sugerido como interpretação para o resultado do experimento 4, optamos por utilizar a D-cicloserina, já que esta droga apresenta-se como ferramenta útil no favorecimento da desestabilização de memórias mais intensas (BUSTOS et al., 2010; ESPEJO et al., 2016) e mesmo para memórias potencializadas pela ação da IOI (GAZARINI et al., 2014). Conforme observado no experimento 6, o efeito amnésico da clonidina sobre a memória original foi evidenciado após a administração de D-cicloserina previamente à exposição do contexto não-pareado. Podemos sugerir que memória pudesse ser evocada mesmo após uma exposição ao contexto não-pareado, mas somente agora, mediante ação da D-cicloserina, possa se tornar lábil e passível da ação amnésica da CLO, ainda que os efeitos não sejam tão pronunciados. O mecanismo preciso pelo qual a D-cicloserina promoveria a desestabilização da memória ainda é discutido, porém, ORTIZ e colaboradores (2015) sugerem que seja mediado pela ativação do complexo ubiquina-proteassoma tentando correlacionar e aproximar de seu mecanismo de intervenção sobre a extinção de uma memória, este por sua vez melhor discutido na literatura (MAO et al., 2008). Mais recentemente, Espejo e colaboradores (2016), demonstraram que a administração prévia de D-cicloserina resgatou a expressão aumentada de GluN₂B e Zif-268 após a sessão de reativação para animais estressados, semelhante ao que é observado naturalmente para animais não estressados, reforçando ainda mais o papel desta droga em facilitar a labilização da memória. Por fim, com relação à dose empregada de D-cicloserina, já foi demonstrado que a mesma não é capaz de provocar qualquer alteração na expressão de medo durante a sessão de reativação e, de forma importante, para reativações curtas, também não levou à potencialização da extinção de maneira eficiente (GAZARINI et al., 2014).

Ainda no experimento 6, foi testada também a possibilidade do tempo de exposição ao contexto não-pareado como fator para facilitar a desestabilização desta memória e assim evidenciar os efeitos amnésicos da clonidina. A duração da sessão de evocação é um fator crucial na indução de desestabilização da memória (LEE et al., 2008; BUSTOS et al, 2010). Contudo, no presente estudo, não foi observado um efeito claro da influência do tempo de evocação para ação amnésica da clonidina. Este dado curiosamente diverge de trabalhos prévios que demonstraram, através do aumento do tempo da sessão de evocação para

5 min, resgatar o efeito amnésico do midazolam para uma memória reforçada pelo estresse prévio (BUSTOS et al. 2010) e do canabidiol em uma memória reforçada por IOI (VANVOSSSEN et al., 2017). Visto que tratamos de uma intervenção indireta a partir de um contexto não associado, o que poderia justificar a maior dificuldade de labilização pela alteração de protocolo, não pode se descartar a influência da questão temporal na desestabilização da memória. Neste caso, mais tempos poderiam ser testados, ou mesmo a combinação de administração prévia de D-cicloserina + 5 minutos de exposição.

Como mencionado, com relação ao experimento 7, sugere-se que mesmo uma única intervenção farmacológica no contexto não associado resultou na alteração da resistência desta memória reforçada, ou seja, num aumento da possibilidade de labilização da memória após a re-exposição ao contexto pareado. Para confirmar essa questão, foi realizado o experimento 8, com o emprego do ifenprodil como ferramenta farmacológica por se tratar de um antagonista específico para a sub-unidade GluN₂B do receptor NMDA (WILLIAMS, 1993). Atualmente há uma dissociação no que diz respeito às subunidades de receptor NMDA, sendo a GluN₂B requerida especificamente para a desestabilização da memória (FLAVELL et al., 2013; MILTON et al., 2013). Ben Mamou e colaboradores (2006) demonstraram que o Ifenprodil foi capaz de prevenir o efeito amnésico da anisomicina, presumidamente por impedir a desestabilização da memória.

O sítio de injeção empregado, no presente trabalho, para administração do ifenprodil foi o hipocampo (experimento 8). A opção por esta estrutura deu-se devido ao vasto número de evidências que relacionam a formação (aquisição e consolidação) (MAREN, PHAN E LIBERZON, 2013) e manutenção (evocação, reconsolidação e extinção) de uma memória contextual como fortemente dependentes do hipocampo (HOLLAND e BOUTON, 1999; FANSELOW, 2000), com destaque para a porção dorsal (YOUNG, BOHENEK, FANSELOW, 1994; MAREN, PHAN, LIBERZON, 2013; ARIAS, MÉNDEZ, ARIAS, 2015). Além disso, trabalhos destacam que esta estrutura também estaria relacionada com a reativação (GROSS e CANTERAS, 2012; CHANG e LIANG, 2016) e desestabilização após reativação de memórias contextuais, através de mecanismos envolvendo degradação proteica (LEE et al., 2008; JAROME et al., 2011). A generalização do medo também parece ser mediada pelo hipocampo, correlacionado ao seu papel no equilíbrio de discriminação de representações contextuais (KHEIRBEK et al., 2012) e em minimizar interferências entre ameaças similares ou dúbias (BERNARD e SAHAY, 2015). No entanto, mesmo

com tantos dados que subsidiassem o envolvimento desta estrutura, a interpretação dos resultados do experimento 8 não é clara. Apesar de que a diferença entre os grupos seja aparente, o erro padrão da média pode justificar a conclusão estatística, além do fato da manipulação ter sido realizada de forma central. Assim, podemos apenas sugerir que o hipocampo tenha grande contribuição nos efeitos observados, através da mediação de processos de labilização cruciais, não excluindo, é claro, participação de demais áreas encefálicas.

A capacidade de modificar um traço de memória em resposta às frequentes alterações do ambiente proporciona uma vantagem clara e revela a relevância funcional da propriedade dinâmica da memória. Experiências extremadamente aversivas (como o condicionamento seguido da injeção de ioimbina) limitam essa propriedade. Neste contexto, os resultados descritos no presente estudo podem contribuir ao entendimento dos mecanismos implicados na formação e modulação de uma memória traumática, um elemento distintivo dos transtornos relacionados ao trauma e estressores.

CONCLUSÕES

- A dose de 2,0 mg/kg de ioimbina provocou generalização das respostas defensivas tanto no protocolo padrão quanto no protocolo modificado;
- A resposta de medo generalizada no contexto não-pareado não se trata, apenas, de uma sensibilização das respostas defensivas. O efeito da ioimbina depende da formação da memória aversiva, quando esta é associada ao contexto de condicionamento;
- A manipulação farmacológica por agente amnésico clonidina após apenas uma exposição ao contexto não-pareado não foi capaz de alterar a expressão da resposta condicionada, bem como não alterou a resposta generalizada;
- Duas exposições ao contexto não-pareado, seguidas da administração de clonidina, resultaram em um prejuízo na expressão da resposta condicionada;
- A administração de D-cicloserina previamente a uma única exposição ao contexto não-pareado seguida da administração de clonidina possibilitou um prejuízo na expressão de congelamento no contexto pareado e tornou a memória original mais susceptível a ação amnésica da clonidina após a exposição ao contexto pareado. O mesmo não foi observado de forma tão evidente para o aumento no tempo de exposição ao contexto não-pareado;
- O tratamento prévio com ifenprodil no hipocampo dorsal bloqueou parcialmente os efeitos da clonidina após exposição ao contexto pareado, indicando que os efeitos observados estão relacionados, pelo menos em parte, à alteração do perfil de labilização da memória potencializada e que o hipocampo pode ser um sítio de grande interesse para investigações futuras.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Limitações e perspectivas do estudo

A janela temporal na qual é possível acessar e alterar o traço de uma memória emocional com agentes amnésicos é pequena e o sucesso da manipulação depende de detalhes sutis no processo de evocação desta memória. Este deve ser o maior desafio tanto na clínica, em pacientes acometidos por traumas, quanto experimentalmente, através do uso de animais. Além disso, diferenças individuais na resposta ao estresse, o que determina animais resilientes e sensíveis, também colabora como uma grande limitação deste estudo e pode justificar, em parte, o perfil heterogêneo dos dados. Com relação aos protocolos adotados, devemos apontar alguns pontos críticos: (i) para confirmar que, de fato, trata-se de um prejuízo de reconsolidação, retestes adicionais deveriam ter sido realizados após 7-10 dias, com o intuito de avaliar a manutenção dos efeitos observados; (ii) ainda, no caso do experimento com duas exposições, seria interessante utilizar uma droga que bloqueie a desestabilização da memória, tal qual a nimodipina, para confirmar qual das duas exposições exerce maior efeito sobre o prejuízo da memória; por fim, (iii) deveriam ser analisadas características e mecanismos moleculares, como por exemplo, marcadores de reconsolidação (expressão de zif-268) e marcadores de labilização (alteração de *trafficking* de subunidades de AMPA e NMDA, atividade de proteossoma, etc). Tais ferramentas forneceriam subsídio aos dados comportamentais aqui apresentados.

A reativação de uma memória pode iniciar processos de reconsolidação ou extinção. Aqui o foco foi dado para a intervenção com a etapa de reconsolidação, porém outro seguimento para este trabalho poderia ser a manipulação da resposta de medo generalizada a partir da extinção desta resposta. Uma sessão mais prolongada (> 15 min) teria o objetivo de induzir a formação de uma memória de extinção e assim causar a supressão da resposta de medo no contexto não-pareado. Neste caso a hipótese de trabalho voltar-se-ia para a possibilidade de que a memória de extinção formada em B seria capaz de provocar alterações na resposta de medo ao contexto original. No entanto mais estudos são necessários para subsidiar esta hipótese, visto que apesar da extinção ser o princípio da terapia de exposição para o tratamento de pacientes com transtornos relacionados a trauma e

estressores, a memória nesses casos parece ser refratária a tal intervenção, limitando o seu uso na clínica.

REFERENCIAS

- ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, v.11, p.180–187. 2001.
- ABERCROMBIE, E. D.; KELLER, R. W.; ZIGMOND, M. J. Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by crodialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies. *Neuroscience*, v. 27, p. 897-904. 1988.
- ADAMEC, R.; HEBERT, M.; BLUNDELL J. Long lasting effects of predator stress on pCREB expression in brain regions involved in fearful and anxious behavior. *Behavioral Brain Research*, v. 222, n.1, p.118-133. 2011.
- AGREN, T. Human reconsolidation: a reactivation and update. *Brain Research Bulletin*, v.105, p.70-82. 2014.
- ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in Neuroscience*, v.28, n.1, p.51-56. 2005.
- ALBERINI, C. M.; LEDOUX, J. E. Memory reconsolidation. *Current Biology*, v.23, n.17, p.746-750. 2013.
- ALFEI, J. M.; MONTI, R. I. F.; MOLINA, V. A.; BUENO, A. M.; URCELAY, G. P. Prediction error and trace dominance determine the fate of fear memories after post-training manipulations. *Learning and Memory*, v. 22, n.8, p. 385-400, 2015.
- ALMEIDA-CORRÊA, S.; AMARAL, O. B. Memory labilization in reconsolidation and extinction – Evidence for a common plasticity system? *Journal of Physiology*, v.108, p. 292–330. 2014.
- American Psychiatric Association*. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th ed.). Arlington, VA: *American Psychiatric Publishing*, p.271–280. 2013.

AMOS, T.; STEIN, D. J.; IPSEY, J. C. Pharmacological interventions for preventing post-traumatic stress disorder (PTSD). *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014.

ANDERSON, M. J.; RICCIO, D. C. Ontogenetic forgetting of stimulus attributes. *Learning and Behavior*, v.33, p.444–453. 2005.

ANDREATTA, M.; LEOMBRUNI, E.; GLOTZBACH-SCHOON, E.; PAULI, P.; MÜHLBERGER, A. Generalization of Contextual Fear in Humans. *Behavior Therapy*, v.46, p.583– 596. 2015.

ANOKHIN, K. V.; TIUNOVA, A. A.; ROSE, S. P. Reminder effects - reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks. *European Journal of Neuroscience*, v.15, p.1759-1765. 2002.

ARIAS, N.; MÉNDEZ, M.; ARIAS, J. L. The importance of the context in the hippocampus and brain related areas throughout the performance of a fear conditioning task. *Hippocampus*, v.25, n.11, p.1242-1249. 2015.

ATON, S. J. Set and setting: how behavioral state regulates sensory function and plasticity. *Neurobiology of Learning and Memory*, v.106, p.1–10. 2013.

BALDI, E.; LORENZINI, C. A.; BUCHERELLI, C. Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, v.81, p.162–166. 2004.

BEN MAMOU, C.; GAMACHE, K.; NADER, K. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nature Neuroscience*, v. 9, p. 1237-1239. 2006.

BERNECKER S. Memory. Oxford: *Oxford University Press*. 2010.

BESNARD, A.; SAHAY, A. Adult Hippocampal Neurogenesis, Fear Generalization and Stress, *Neuropsychopharmacology*. Jun, 2015.

BIEDENKAPP, J. C.; RUDY, J. W. Context preexposure prevents forgetting of a contextual fear memory: implication for regional changes

in brain activation patterns associated with recent and remote memory tests. *Learning and Memory*, v.14, p.200-203. 2007.

BLISS, T. V. P.; LØMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, v. 232, n.2, p. 331-356. 1973.

BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, v. 361, n.6047, p. 31-39. 1993.

BOUTON, M. Context, ambiguity, and unlearning: Sources of relapse after behavioral extinction. *Biological Psychiatry*, v.52, p. 976–986. 2002.

BURKE, A.; HEUER, F.; REISBERG, D. Remembering emotional events. *Memory and Cognition*, v. 20, n. 3, p. 277-290, 1992.

BUSTOS, S. G.; GIACHERO, M.; MALDONADO, H.; MOLINA, V. A. Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-reactivation Dycloserine administration. *Neuropsychopharmacology*, v.35, n.5, p.1097-1080, 2010.

BUSTOS, S. G.; MALDONADO, H.; MOLINA, V. A. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology*, v. 34, n. 2, p. 446-457, 2009.

BYLUND, D. B. Receptors for norepinephrine and signal transduction pathways. Em: ORDWAY GA, SCHWARTZ MA, FRAZER A (Eds.). *Brain Norepinephrine: Neurobiology and Therapeutics*. New York: Cambridge University Press, p.105-130, 2007.

CAIN, C. K.; MAYNARD, G. D.; KEHNE, J. H. Targeting memory processes with drugs to prevent or cure PTSD. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 21, p. 1323-1350, 2012.

CAMMAROTA, M.; BEVILACQUA, L. R.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learning and Memory*, v. 11, p. 572-578. 2004.

CHA, J.; GREENBERG, T.; CARLSON, J. M.; DEDORA, D. J.; HAJCAK, G.; MUJICA-PARODI, L. R. Circuit-Wide Structural and Functional Measures Predict Ventromedial Prefrontal Cortex Fear Generalization: Implications for Generalized Anxiety Disorder. *The Journal of Neuroscience*, v. 34, n. 11, p. 4043-4053, 2014.

CHANG, S. D.; LIANG, K. C. The hippocampus integrates context and shock into a configural memory in contextual fear conditioning. *Hippocampus*. 2016.

CONWAY, E. L.; JARROTT, B. Tissue pharmacokinetics of clonidine in rats. *Journal Pharmacokinetic Biopharm*, v.10, p.187–200. 1982.

CRESPI, F. Anxiolytics antagonize yohimbine-induced central noradrenergic activity: a concomitant in vivo voltammetry-electrophysiology model of anxiety. *Journal of Neuroscience Methods*, v.180, p.97-105. 2009.

CULLEN, P. K.; GILMAN, T. L.; WINIECKI, P.; RICCIO, D. C.; JASNOW, A. M. Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. *Neurobiology of Learning and Memory*, v.124, p.19–27. 2015.

DAVIS, H. P.; SQUIRE, L. R. Protein synthesis and memory: a review. *Psychological Bulletin*, v. 96, p.518-559. 1984.

DE OLIVEIRA ALVARES, L.; CRESTANI, A. P.; CASSINI, L. F.; HAUBRICH, J.; SANTANA, F.; QUILLFELDT, J. A. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*, v. 244, p. 42-48. 2013.

DEBOCK, F.; KURZ, J.; AZAD, S. C.; PARSONS, C. G.; HAPFELMEIER, G.; ZIEGLGÄNSBERGER, W.; RAMMES, G. 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. *European Journal of Neuroscience*, v. 17, n.7, p.1411-1424. 2003.
- DESMEDT, A.; MARIGHETTO, A.; PIAZZA, P. V. Abnormal Fear Memory as a Model for Posttraumatic Stress Disorder. *Biological Psychiatry*, v. 78, n. 5, p. 290-297, 2015.
- DEVIETTI, T. L.; HOLLIDAY, J. H.; LARSON, R. C. Comparison of amnesias induced by electroconvulsive shock administered after training-trial footshock or noncontingent footshock in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v.84, p. 579–585. 1973.
- DÍAZ-MATAIX, L.; RUIZ MARTINEZ, R. C.; SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E.; DOYÈRE, V. Detection of a temporal error triggers reconsolidation of amygdala-dependent memories. *Current Biology*, v. 23, p. 467–472. 2013.
- DUDAI Y. Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Current Opinion in Neurobiology*, v.16, n. 2., p.174-178. 2006.
- DUDAI, Y. Memory from A to Z: keywords, concepts, and beyond. *Oxford University Press*, v. 12, p. 211-2016, 2002.
- DUDAI, Y. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annual Review of Psychology*, v. 55, p. 51-86, 2004.
- DUDAI, Y. The neurobiology of memory. Concepts, findings, trends. *Oxford University Press*, Oxford. 1989.
- DUNBAR, A. B.; TAYLOR, J. R. Reconsolidation and psychopathology: Moving towards reconsolidation-based treatments. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2016.
- DUNCAN, C. P. The retroactive effect of electroshock on learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, n. 42, v.1, p.32-44. 1949.
- DUNSMOOR, J. E.; MITROFF, S. R.; LABAR, K. S. Generalization of conditioned fear along a dimension of increasing fear intensity. *Learning and Memory*, v. 16, n. 7, p. 460-469, 2009.

DUNSMOOR, J. E.; PAZ, R. Fear Generalization and Anxiety: Behavioral and Neural Mechanisms. *Biological Psychiatry*, v. 78, n. 5, p. 336-343, 2015.

DYMOND, S.; DUNSMOOR, J. E.; VERVLIIET, B.; ROCHE, B.; HERMANS, D. Fear Generalization in Humans: Systematic Review and Implications for Anxiety Disorder Research. *Behavior Therapy*, v.4. 2014.

EINARSSON, E. Ö.; PORS, J.; NADER, K. Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. *Neuropsychopharmacology*, v. 40, n. 2, p. 480-487, 2015.

EISENBERG, M.; KOBILO, T.; BERMAN, D.E.; DUDAI, Y. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science*, v. 301, p. 1102-1104, 2003.

ELZINGA, B. M.; BREMNER, J. D. Are the neural substrates of memory the final common pathway in posttraumatic stress disorder (PTSD)? *Journal of Affective Disorders*, v.70, p.1-17. 2002.

ESPEJO, P. J.; ORTIZ, V.; MARTIJENA, I. D.; MOLINA, V. A. Stress-induced resistance to the fear memory labilization/reconsolidation process: Involvement of the basolateral amygdala complex. *Neuropharmacology*. 2016.

ETKIN, A.; BÜCHEL, C.; GROSS, J. J. The neural bases of emotion regulation. *Nature reviews – Neuroscience*, v.16, nov.2015.

FANSELOW, M. S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behavioral Brain Research*, v.10, n. 1-2, p.73-81. 2000.

FANSELOW, M. S. Factors governing one-trial contextual conditioning. *Animal Learning & Behavior*, v.18, n.3, p.264-270. 1990.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, v. 65, n.1, p.7-19. 2010.

- FINNIE, P.; NADER, K. The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.36, p.1667–1707. 2012.
- FLAVELL, C. R.; LAMBERT, E. A.; WINTERS, B. D.; BREDY, T. W. Mechanisms governing the reactivation dependent destabilization of memories and their role in extinction. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 7, n.214. 2013.
- FORCATO, C.; BURGOS, V. L.; ARGIBAY, P. F.; MOLINA, V. A.; PEDREIRA, M. E.; MALDONADO, H. Reconsolidation of declarative memory in humans. *Learning and Memory*, v.14, p.295–303. 2007.
- FORCATO, C.; FERNANDEZ, R. S.; PEDREIRA, M. E. Strengthening a consolidated memory: The key role of the reconsolidation process. *Journal of Physiology – Paris*, v.108, p. 323–333. 2014.
- FORCATO, C.; RODRIGUEZ, M. L. C.; PEDREIRA, M. E. Repeated Labilization-Reconsolidation Processes Strengthen Declarative Memory in Humans. *PLoS ONE*, v.6, n.8. 2011.
- FRANKLAND, P. W.; DING, H. K.; TAKAHASHI, E.; SUZUKI, A.; KIDA, S.; SILVA, A. J. Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learning and Memory*, v. 13, p. 451-457, 2006.
- FRENKEL, L.; MALDONADO, H.; DELORENZI, A. Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. *European Journal of Neuroscience*, v.22, p.1757–1766. 2005.
- GALEOTTI, N.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. Alpha-2 agonist induced memory impairment is mediated by the alpha-2A-adrenoceptorsubtype. *Behavioral Brain Research*, v. 153, n.2, p.409-417. 2004.
- GAMACHE, K.; PITMAN, R. K.; NADER, K. Preclinical evaluation of reconsolidation blockade by clonidine as a potential novel treatment for posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology*, v.37, p.2789-2796. 2012.

GAZARINI, L. Revisitando os mecanismos de modulação noradrenérgica sobre as memórias de medo: do fisiológico ao disfuncional. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2015.

GAZARINI, L.; STERN, C. A.; CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting α 1- and β - adrenergic receptors. *Learning and Memory*, v. 20, n. 4, p. 210-219. 2013.

GAZARINI, L.; STERN, C. A.; PIORNEDO, R. R.; TAKAHASHI, R. N.; BERTOGLIO, L. J. PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 18, n. 1, 2014.

GHOSH, S.; CHATTARJI, S. Neuronal encoding of the switch from specific to generalized fear. *Nature Neuroscience*, v. 18, p. 112-120, 2015.

GLICKMAN, S. Preservative neural processes and consolidation of the memory trace. *Psychological Bulletin*, n. 58, v.3, p.218-33. 1961.

GLORE, J. *Personal Arts*. (SCR Theatre, Costa Mesa, CA), v.2. 1987.

GOELET, P., CASTELLUCCI, V. F.; SCHACHER, S., KANDEL, E. R. The long and the short of long-term memory-a molecular framework. *Nature*, v. 322, p.419-422. 1986.

GOLD, P. E. Regulation of memory – From the adrenal medulla to liver to astrocytesto neurons. *Brain Research Bulletin*, p. 25-35, 2014.

GOLD, P. E.; WELSH, K. A. Regional brain catecholamines and memory: effects of footshock, amygdala implantation, and stimulation. *Behavioral Neural Biology* 47(2):116-129. 1987.

GOZZANI, J. L.; IZQUIERDO I. Possible peripheral adrenergic and central dopaminergic influences in memory consolidation. *Psychopharmacology*, v.49, p.109-111. 1976.

GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 13, n. 9, p. 651-658, 2012.

HAMANN, S. Cognitive and neural mechanisms of emotional memory. *Trends in Cognitive Sciences*, v. 5, n. 9, p.394-400, 2001.

HARDT, O.; EINARSSON, E.O.; NADER, K. A bridge over troubled water: reconsolidation as a link between cognitive and neuroscientific memory research traditions. *Annual Review of Psychology*, v. 61, p.141-167, 2010.

HARRIS, E. W.; GANONG, A. H.; COTMAN, C. W. Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Research*, v. 323, n.1, p.132-137. 1984.

HAUBRICH, J.; CRESTANI, A. P.; CASSINI, L. F.; SANTANA, F.; SIERRA, R. O.; ALVARES, L. D. E. O.; QUILLFELDT, J. A. Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology*, v.40, n.2, p.315-26. 2015.

HEBB, D. O. *The Organisation of Behaviour*. New York: Wiley. 1949.
HOLLAND, P.; BOUTON, M. Hippocampus and context in classical conditioning. *Current. Opinion. in Neurobiology*, v.9, p.195–202. 1999.

HONG, I.; KIM, J.; KIM, J.; LEE, S.; KO, H.G.; NADER, K.; KAANG, B. K.; TSIEN, R. W.; CHOI, S. AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 20, p. 8218-8223, 2013.

HUBBARD, J. W.; PFISTER, S. L.; BIEDIGER, A. M.; HERZIG, T. C.; KEETON, T. K. The pharmacokinetic properties of yohimbine in the conscious rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology*, v.337, p.583-587. 1988.

HUCKLEBERRY, K. I.; FERGUSON, L. B.; DREW, M. R. Behavioral mechanisms of context fear generalization in mice. *Learning and memory*, n. 23:703–709. 2016.

HUPBACH, A.; HARDT, O.; GOMEZ, R.; NADEL, L. The dynamics of memory: context-dependent updating. *Learning and Memory*, v.15, p. 574–579. 2008.

INDA, M. C.; MURAVIEVA, E. V.; ALBERINI, C. M. Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *Journal of Neuroscience*, v.31, n.5, p. 1635–1643. 2011.

ITZHAK, Y.; PEREZ-LANZA, D.; LIDDIE, S. The strength of aversive and appetitive associations and maladaptive behaviors. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life Journal*, v.66, n.8, p.559-71. 2014.

IVANOV, A.; ASTON-JONES, G. Extranuclear dendrites of locus coeruleus neurons: activation by glutamate and modulation of activity by alpha adrenoceptors. *Journal of Neurophysiology*, v.74, p.2427-2436. 1995.

IZQUIERDO, I. Memória. p. 92, ed. ARTMED - São Paulo, 2002.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R. M.; ROSSATO, J. I.; BONINI, J. S.; MEDINA, J. H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neuroscience*, v.29, p.496-505. 2006.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C. Fear memory. *Physiological Reviews*, v.96, p.695–750, 2016.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; VIANNA, M. R.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioral Brain Research*, v.103, n.1, p.1-11. 1999.

JAROME, T. J.; FERRARA, N. C.; KWAPIS, J. L.; HELMSTETTER, F. J. CaMKII regulates proteasome phosphorylation and activity and promotes memory destabilization following retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, v.128, p.103–109. 2016.

JAROME, T. J.; KWAPIS, J. L.; WERNER, C. T.; PARSONS, R. G.; GAFFORD, G. M.; HELMSTETTER, F. J. The timing of multiple retrieval events can alter GluR1 phosphorylation and the requirement for

protein synthesis in fear memory reconsolidation. *Learning and memory*, v. 19, p.300–306. 2012.

JAROME, T. J.; WERNER, C. T.; KWAPIS, J. L.; HELMSTETTER, F. J. Activity dependent protein degradation is critical for the formation and stability of fear memory in the amygdala. *PLoS One*, v.6, n.9, p.243-249. 2011.

JASNOW, A. M.; LYNCH, J. F.; GILMAN, T. L.; RICCIO, D. C. Perspectives on fear generalization and its implications for emotional disorders. *Journal of Neuroscience Research*. 2016.

JOËLS, M.; FERNANDEZ, G.; ROOZENDAAL, B. Stress and emotional memory: a matter of timing. *Trends in Cognitive Sciences*, v. 15, n. 6, p. 280-288, 2011.

JOHANSEN, J. P.; CAIN, C.K; OSTROFF, L. E.; LEDOUX, J. E. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, v. 147, n. 3, p. 509-524. 2011.

JOVANOVIC, T.; NORRHOLM, S. D.; FENNELL, J. E.; KEYES, M.; FIALLOS, A. M.; MYERS, K. M.; DAVIS, M.; DUNCAN, E. J. Posttraumatic stress disorder may be associated with impaired fear inhibition: relation to symptom severity. *Psychiatry Research*, v.167, p.151-160. 2009.

KAOUANE, N.; PORTE, Y.; VALLÉE, M.; BRAYDA-BRUNO, L.; MONS, N.; CALANDREAU, L.; MARIGHETTO, A.; PIAZZA, P. V.; DESMEDT, A. Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. *Science*, v. 335, n. 6075, p. 1510-1513, 2012.

KHEIRBEK, M. A.; KLEMENHAGEN, K. C.; SAHAY, A; HEN, R. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nature Neuroscience*, v.15, n.12. 2012.

KIM, J. J.; JUNG, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.30, n.2, p.188-202. 2006.

KIM, R.; MOKI, R.; KIDA S. Molecular mechanisms for the destabilization and restabilization of reactivated spatial memory in the Morris water maze. *Molecular Brain*, v.11, p.4:9. 2011.

KINDT, M.; EMMERIK, A. New avenues for treating emotional memory disorders: towards a reconsolidation intervention for posttraumatic stress disorder. *Therapy Advanced Psychopharmacology*, v.6, n.4, p.283–295. 2016.

KINDT, M.; SOETER, M.; SEVENSTER, D. Disrupting reconsolidation of fear memory in humans by a noradrenergic β -blocker. *Journal of Visualized Experiments*, v. 94. 2014.

KLEIM, B.; EHLERS, A. Reduced autobiographical memory specificity predicts depression and posttraumatic stress disorder after recent trauma. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, v.76, n.2, p.231-242. 2008.

KNIERIM, J. J.; LEE, I.; HARGREAVES, E. L. Hippocampal place cells: parallel input streams, subregional processing, and implications for episodic memory. *Hippocampus*, v. 16, n. 9, p. 755-764, 2006.

KORB, E.; FINKBEINER, S. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends in Neuroscience*, v.34, n.11, p.591-598. 2011.

KOSTEK, J. A.; BECK, K. D.; GILBERTSON, M. W.; ORR, S. P.; PANG, K. C.; SERVATIUS, R. J.; MYERS, C. E. Acquired Equivalence in U.S. Veterans With Symptoms of Posttraumatic Stress: Reexperiencing Symptoms Are Associated With Greater Generalization. *Journal of Trauma Stress*, v. 27, n.6, p.717-720. 2014.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Amnésias. *Neurobiology of Mental Disorders*, p. 157-187. Nova York: Nova Publishers. 2006.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; DECOLA, J. P.; KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Immediate shock deficit in fear conditioning: Effects of shock manipulations. *Behavioral Neuroscience*, v.120, p.873-879. 2006.

LANE, R.; RYAN, L.; NADEL, L.; GREENBERG, L. Memory reconsolidation, emotional arousal and the process of change in

psychotherapy: new insights from brain science. *Behavioral Brain Science*, v.38, p.1 – 64. 2105.

LECHNER, H.; SQUIRE, L. R.; BYRNE, J. H. 100 Years of Consolidation - Remembering Müller and Pilzecker. *Learning and Memory*, v.6, p.77-87. 1999.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, v. 23, p. 155-184, 2000.

LEDOUX, J. E.; PINE, D. S. Using Neuroscience to Help Understand Fear and Anxiety: A Two-System Framework. *American Journal of Psychiatry*, v.173, n.11, p.1083-1093. 2016.

LEE, J. L. C.; FLAVELL, C. R. Inhibition and enhancement of contextual fear memory destabilization. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*.v.8. 2014.

LEE, J. L. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neuroscience*, v.11, p. 1264–1266. 2008.

LEE, J. L. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Frontiers of Behavioral Neuroscience*, v. 4, p.168. 2010.

LEE, J. L. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 4, n. 168, 2010.

LEUNER, B.; FALDUTO, J.; SHORS, T. J. Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, v.23, p.659–665. 2003.

LEWIS, D. J. Psychobiology of active and inactive memory. *Psychology Bulletin*, v. 86, p.1054-1083. 1979.

LI, C. J.; ZHOU, M.; LI, H. G.; L, V. Q.; XU, X. L.; GUO, L. J. Clonidine suppresses the induction of long-term potentiation by inhibiting HCN channels at the Schaffer collateral-CA1 synapse in

anesthetized adult rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v.33, n.8, p.1075-1086. 2013.

LISSEK, S. Toward an account of clinical anxiety predicated on basic, neurally mapped mechanisms of Pavlovian fear-learning: the case for conditioned overgeneralization. *Depression and anxiety*, v.29, p.257-263. 2012.

LIU, L.; WONG, T. P.; POZZA, M. F.; LINGENHOEHL, K.; WANG, Y.; SHENG, M. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science*, n. 304, v. 5673, p.1021–1024. 2004.

LOPEZ, J.; GAMACHE, K.; SCHNEIDER, R.; NADER, K. Memory Retrieval Requires Ongoing Protein Synthesis and NMDA Receptor Activity-Mediated AMPA Receptor Trafficking. *Journal of Neuroscience*, v.35, n.6, p.2465-2475. 2015.

LYNCH, J.; CULLEN, P. K.; JASNOW, A. M.; RICCIO, D. C. Sex Differences in the Generalization of Fear as a Function of Retention Intervals. *Learning and Memory*, v.20, n.11, p.628-632. 2013.

MACMILLAN, L. B.; HEIN, L.; SMITH, M. S.; PIASCIK, M. T.; LIMBIRD, L. E. Central hypotensive effects of the alpha2-adrenergic receptor subtype. *Science*, v. 273, p. 801–803. 1996.

MACTUTUS, C. F.; RICCIO, D. C.; FERREK, J. M. Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. *Science*, v.204, n.4399, p.1319-1320. 1979.

MAREN, S.; PHAN, K. L.; LIBERZON, I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature reviews Neuroscience*, v. 14, p. 417-428, 2013.

MCCARTY, R.; GOLD, P. E. Plasma catecholamines: effects of footshock level and hormonal modulators of memory storage. *Hormones Behavior*, v.15, n.2, p.168- 182. 1981.

MCCLELLAND, J. L.; MCNAUGHTON, B. L.; O'REILLY, R. C. Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist

models of learning and memory. *Psychology Reviews*, v.102, p. 419–457. 1995.

MCGAUGH, J. L., HERZ, M. J. Memory Consolidation. *San Francisco: Albion Publishing Company*, 1972.

MCGAUGH, J. L. Making lasting memories: Remembering the significant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, p. 10402-10407, 2013.

MCGAUGH, J. L. Memory – a Century of Consolidation. *Science*, v.287, n.5451, p. 248-251, 2000.

MCGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. *Science*, n.153, p.1351–1358. 1966.

MCGAUGH, J. L.; HERZ, M. J. Memory consolidation. *San Francisco: Albion Publishing Company*, 1972.

MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications. *Psychopharmacology*, v.202, p.1–14. 2009.

MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 12, n. 2, p. 205-210, 2002.

MCLAREN, I. P. L.; KAYE, H.; MACKINTOSH, N. J. An associative theory of the representation of stimuli: applications to perceptual learning and latent inhibition. In *R.G.M. Morris (Ed.) Parallel Distributed Processing - Implications for Psychology and Neurobiology*. Oxford. 1989.

MERLO, E.; MILTON, A. L.; GOOZÉE, Z. Y.; THEOBALD, D. E.; EVERITT, B. J. Reconsolidation and Extinction Are Dissociable and Mutually Exclusive Processes: Behavioral and Molecular Evidence. *The Journal of Neuroscience*, v. 34, n. 7, p. 2422-2431, 2014.

MILEKIC, M. H.; ALBERINI, C. M. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron*, v 36, p. 521-525, 2002.

MILNER, B.; SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. Cognitive Neuroscience and the Study of Memory. *Neuron*, v. 20, p. 445-468, 1998.

MILTON, A. L.; MERLO, E.; RATANO, P.; GREGORY, B. L.; DUMBRECK, J.K.; EVERITT, B. J. Double dissociation of the requirement for GluN2B- and GluN2A-containing NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory. *The Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 3, p. 1109-1115, 2013.

MISANIN, J. R.; MILLER, R.R.; LEWIS, D. J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace *Science*, v. 160, n. 3827, p. 554-555, 1968.

MONDACA, M.; HERNÁNDEZ, A.; PÉREZ, H.; VALLADARES, L.; SIERRALTA, W.; FERNÁNDEZ, V.; SOTO-MOYANO, R. Alpha2-adrenoceptor modulation of long-term potentiation elicited in vivo in rat occipital cortex. *Brain Research*, v.1021, p.292-296. 2004.

MONTI, R. I. F.; GIACHERO, M.; ALFEI, J. M.; ADRIAN, M. B.; CUADRA, G.; MOLINA, V. A. An appetitive experience after fear memory destabilization attenuates fear retention: involvement GluN2B-NMDA receptors in the Basolateral Amygdala Complex. *Learning and Memory*, v.23, p.465-478. 2016.

MORRIS, R. G. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *European Journal of Neuroscience*, v.23, n11, p.:2829-2846. 2006.

MÜLLER, G. E.; PILZECKER, A. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss. *Zeitschrift fuer Psychologie*, suppl.1, p. 1–288, 1900.

NADER K. Reconsolidation and the Dynamic Nature of Memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v.7, n.10. 2015

NADER, K.; EINARSSON, E. O. Memory reconsolidation: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1191, p.27-41. 2010.

NADER, K.; HARDT, O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience*, v.10, n.3, p.224-234. 2009.

- NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J.E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, v. 406, p. 722-726, 2000.
- NICHOLAS, A. P.; HÖKFELT, T.; PIERIBONE, V. A. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol Sci*, v. 17, p.245-255. 1996.
- O'CARROLL, R. E.; DRYSDALE, E.; CAHILL, L.; SHAJAHAN, P.; EBMEIER, K. P. Stimulation of the noradrenergic system enhances and blockade reduces memory for emotional material in man. *Journal of Psychiatry in Medicine*, v.29, p.1-6. 1999.
- O'DONNELL, T.; HEGADOREN, K. M.; COUPLAND, N. C. Noradrenergic mechanisms in the pathophysiology of post-traumatic stress disorder. *Neuropsychobiology*, v.50, p.273-283. 2004.
- OLSON, V. G.; ROCKETT, H. R.; REH, R. K.; REDILA, V. A.; TRAN, P. M.; VENKOVHA; DEFINO, M. C.; HAGUE, C.; PESKIND, E. R.; SZOT, P.; RASKIND, M. A. The role of norepinephrine in differential response to stress in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry*, v.70, p.441-448. 2011.
- ONAT, S.; BÜCHEL, C. The neuronal basis of fear generalization in humans. *Nature neuroscience*, v.18, p. 1811-1818. 2015.
- ORTIZ, V.; GIACHERO, M.; ESPEJO, P. J.; MOLINA, V. A.; MARTIJENA, I. D. The effect of Midazolam and Propranolol on fear memory reconsolidation in ethanol-withdrawn rats: influence of d-cycloserine. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 18, n. 4, 2015.
- PARÉ, D. Mechanisms of Pavlovian fear conditioning: has the engram been located? *Trends in Neuroscience*, v.25, n.9, p.436-438. 2002.
- PARSONS, R. G.; RESSLER, K. J. Implications of memory modulation for posttraumatic stress and fear disorders. *Nature Neuroscience*, v.16, n.2, p.146-53. 2013.
- PAVLOV, I. P. Conditioned reflexes. *London: Oxford University Press*. 1927.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. *San Diego, Academic Press*. 2009.

PEDREIRA, M. E.; MALDONADO, H. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*, v. 38, p. 863-869, 2003.

PERUSINI, J. N.; FANSELOW, M. S. Neurobehavioral perspectives on the distinction between fear and anxiety. *Learning and Memory*, v.22, n.9, p.417-425. 2015

PITMAN, R. K. Post-traumatic stress disorder, hormones, and memory. *Biological Psychiatry*, v. 26, p.221-223. 1989.

PORTES, M. A. M. Adrenalina e noradrenalina promovem a generalização da resposta de medo por ativarem receptores alfa-1 e beta adrenérgicos do córtex pré-límbico durante a consolidação de uma memória aversiva. 100 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2016.

POULOS, A. M.; MEHTA, N.; LU, B.; AMIR, D.; LIVINGSTON, B.; SANTARELLI, A.; ZHURAVKA, A.; FANSELOW, M. S. Conditioning and time-dependent increases in context fear and generalization. *Learning and Memory*, n. 23, p.379–385. 2016.

PRZYBYSLAWSKI, J.; ROULLET, P.; SARA, S. J. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *The Journal of Neuroscience*, v. 19, p. 6623-6628, 1999.

QUERVAIN, D. de; SCHWABE, L.; ROOZENDAAL, B. Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, n.1. 2017.

RAO-RUIZ, P.; ROTARU, D. C.; VAN DER LOO, R. J.; MANSVELDER, H. D.; STIEDL, O.; SMIT, A. B.; SPIJKER, S. Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nature Neuroscience*, v. 14, p. 1302-1308, 2011.

RASMUSSEN, K.; JACOBS, B. L. Single unit activity of locus coeruleus neurons in the freely moving cat. Conditioning and pharmacologic studies. *Brain Research*, v.371, n.2, p.:335-344. 1986.

RESTIVO, L.; VETERE, G.; BONTEMPI, B.; AMMASSARI-TEULE, M. The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *Journal of Neuroscience*, v.29, n25, p.8206-8214. 2009

RIBOT, T. Diseases of memory. *New York: Appleton*. 1882.

RICCIO, D. C.; JOYNES, R. L. Forgetting of stimulus attributes: some implications for hippocampal models of memory. *Learning and Memory*, v.14, p.430-432. 2007.

RODRIGUEZ, W. A.; HORNE, C. A.; PADILLA, J. L. Effects of glucose and fructose on recently reactivated and recently acquired memories. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, v.23, p.1285-1317. 1999.

ROOZENDAAL, B.; BARSEGYAN, A.; LEE, S. Adrenal stress hormones, amygdala activation, and memory for emotionally arousing experiences. *Progress in Brain Research*, v. 167, p. 79-97, 2008.

ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Memory modulation. *Behavioral Neuroscience*, v. 125, n. 6, p. 797-824, 2011.

ROZESKE, R. R.; VALERIO, S.; CHAUDUN, F.; HERRY, C. Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. *Genes, Brain and Behavior*, v. 14, n. 1, p. 22-36, 2014.

RUEDIGER, S.; VITTORI, C.; BEDNAREK, E.; GENOUD, C.; STRATA, P.; SACCHETTI, B.; CARONI, P. Learning related feedforward inhibitory connectivity growth required for memory precision. *Nature*, v.473, p.514-518. 2011.

SARA, S. J. Reconsolidation: Historical Perspective and Theoretical Aspects. *Learning Theory and Behavior*, v.1 de *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*, p. 461-476, 2008.

SARA, S. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learning and Memory*, v. 7, n.2, p. 73-84, 2000.

SCHWABE, L.; NADER, K.; PRUESSNER, J. C. β -Adrenergic blockade during reactivation reduces the subjective feeling of remembering associated with emotional episodic memories. *Biological Psychology*, v. 92, n. 2, p. 227-232, 2013.

SHEPARD, R. N. Toward a universal law of generalization for psychological science. *Science*, v. 237, p.1317-1323. 1987.

SHIN, L. M.; LIBERZON, I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*, v. 35, n.1, p.169-191. 2010.

SOETER, M.; KINDT, M. High trait anxiety: a challenge for disrupting fear memory reconsolidation. *PLoS One*, v. 8, n. 11, 2013.

SOETER, M.; KINDT, M. Stimulation of the noradrenergic system during memory formation impairs extinction learning but not the disruption of reconsolidation. *Neuropsychopharmacology*, v. 37, p. 1204-1215, 2012.

SOL FUSTIÑANA, M.; DE LA FUENTE, V.; FEDERMAN, N.; FREUDENTHAL, R.; ROMANO, A. Protein degradation by ubiquitin proteasome system in formation and labilization of contextual conditioning memory. *Learning and Memory* v. 21, n. 9, p. 478-487, 2014.

SPEAR, N. Retrieval of memory in animals. *Psychological Reviews*, v.80, p. 163-194, 1973.

SQUIRE, L. R.; GENZEL, L.; WIXTED, J. T.; MORRIS, R. G. Memory Consolidation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, v.7, p.1-21. 2015.

STARKE, K. Presynaptic autoreceptors in the third decade: focus on alpha 2-adrenoceptors. *Journal of Neurochemistry*, v. 78, n. 4, p. 685-693, 2001.

SUZUKI, A.; MUKAWA, T.; TSUKAGOSHI, A.; FRANKLAND, P. W.; KIDA, S. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learning and Memory*, v. 15, n. 6, p. 426-433, 2008.

SWANN, A. C.; BIRNBAUM, D.; JAGAR, A. A.; DOUGHERTY, D. M.; MOELLER, F. G. Acute yohimbine increases laboratory-measured impulsivity in normal subjects. *Biological Psychiatry*, v. 57, p. 1209-1211. 2005.

THOME, J.; KOPPE, G.; HAUSCHILD, S.; LIEBKE, L.; SCHMAHL, C.; LIS, S. Modification of Fear Memory by Pharmacological and Behavioral Interventions during Reconsolidation. *PLoS ONE*, v. 11, n. 8, p. 0161044. 2016.

TINOCO-GONZÁLEZ, D. Conditioned Fear Acquisition and Generalization in Generalized Anxiety Disorder. *Behavior Therapy*, v. 46, p. 627-639. 2015.

TRONSON, N. C.; TAYLOR, J. R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 8, n. 4, p. 262-275, 2007.

TULLY, K.; BOLSHAKOV, V. Y. Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. *Molecular Brain*, v. 3, p. 15. 2010.

TZINGOUNIS, A. V.; NICOLL, R. A. Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron*, v. 52, n. 3, p. 403-407. 2006.

VAN STEGEREN AH. The role of the noradrenergic system in emotional memory. *Acta Psychologica*, v. 127, p. 532-541. 2008.

VAN STEGEREN, A. H.; EVERAERD, W.; CAHILL, L.; MCGAUGH, J. L.; GOOREN, L. J. Memory for emotional events: differential effects of centrally versus peripherally acting beta-blocking agents. *Psychopharmacology*, v. 138, n. 3-4, p. 305-310. 1998.

VANVOSSSEN, A. C.; PORTES, M. A.; SCOZ-SILVA, R.; REICHMANN, H. B.; STERN, C. A.; BERTOGLIO, L. J. Newly

acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prelimbic cortex NMDA receptors. *Neurobiology of Learning and Memory*, v.137, p.154-162. 2017.

VETERE, G.; RESTIVO, L.; COLE, C. J.; ROSS, P. J.; AMMASSARITEULE, M.; JOSSELYN, S. A.; FRANKLAND, P. W. Spine growth in the anterior cingulate cortex is necessary for the consolidation of contextual fear memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 20, p. 8456–8460, 2011.

VOLIANSKIS, A.; FRANCE, G.; JENSEN, M. S.; BORTOLOTTI, Z. A.; JANE, D. E.; COLLINGRIDGE, G. L. Long-term potentiation and the role of N-methyl-d-aspartate receptors. *Brain Research*. 2015.

WANG, S. H.; DE OLIVEIRA ALVARES, L.; NADER, K. Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nature Neuroscience*, v.12, n.7, p. 905-912. 2009.

WHALLEY, K. Face-to-face with fear generalization. *Nature Reviews Neuroscience*, n.17. 2016.

WILLIAMS, K. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Molecular Pharmacology*, v. 44, p.851–859. 1993.

WILTGEN, B. J.; SILVA, A. J. Memory for context becomes less specific with time. *Learning and Memory*, v. 14, n. 4, p. 313-317, 2007.

WINOCUR, G.; MOSCOVITCH, M.; BONTEMPI, B. Memory formation and long-term retention in humans and animals: convergence towards a transformation account of hippocampal-neocortical interactions. *Neuropsychology*, v.48, p.2339–2356. 2010.

WIXTED, J. T., CAI, D. J. Memory Consolidation. Em *Oxford Handbook of Cognitive Neuroscience* (v. 2, p.436-455). *Oxford University Press, New York*. 2013.

- XU, W.; SÜDHOF, T. C. A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science*, v.339, n. 6125, p.1290-1295. 2013.
- YAMAMOTO, K.; SHINBA, T.; YOSHII, M. Psychiatric symptoms of noradrenergic dysfunction: a pathophysiological view. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 68, n. 1, p. 1-20, 2014.
- YEHUDA, R.; JOËLS, M.; MORRIS, R. G. The memory paradox. *Nature Reviews Neuroscience*, v.11, n.12, p.837-839. 2010.
- YEHUDA, R.; MCFARLANE, A. C.; SHALEV, A. Y. Predicting the development of posttraumatic stress disorder from the acute response to a traumatic event. *Biological Psychiatry*, v.44, p.1305-1313. 1998.
- YOUNG, S.; BOHENEK, D.; FANSELOW, M. NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context preexposure. *Behavioral Neuroscience*, v.108, p.19–29. 1994.
- ZHANG, W. P.; OUYANG, M.; THOMAS, S. A. Potency of catecholamines and other L-tyrosine derivatives at the cloned mouse adrenergic receptors. *Neuropharmacology*, v. 47, n. 3, p. 438-449, 2004.
- ZHENG, H.; RINAMAN, L. Yohimbine anxiogenesis in the elevated plusmaze requires hindbrain noradrenergic neurons that target the anterior ventrolateral bed nucleus of the stria terminalis. *European Journal of Neuroscience*, v.37, n.8, p.1340-1349. 2013.
- ZOLADZ, P. R.; DIAMOND, D. M. Current status on behavioral and biological markers of PTSD: a search for clarity in a conflicting literature. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, n.37, p.860-895. 2013.