

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

**FERNANDA TROYNER**

**PAPEL DO NÚCLEO REUNIENS DO TÁLAMO NA  
CONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Bertoglio

**Florianópolis**

**2017**

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

Troyner, Fernanda

Papel do núcleo reuniens do tálamo na consolidação de  
memórias aversivas / Fernanda Troyner ; orientador, Leandro  
José Bertoglio - Florianópolis, SC, 2017.

125 p.

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

Inclui referências

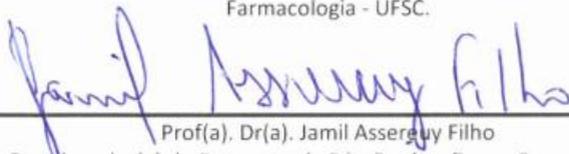
1. Farmacologia. 2. Memória. 3. Núcleo Reuniens. I.  
Bertoglio, Leandro José. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III.  
Título.

“Papel do núcleo reuniens do tálamo na consolidação de memórias aversivas”

Por

**Fernanda Troyner**

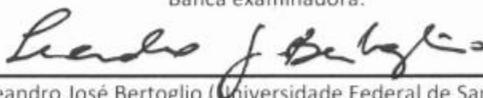
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (08/PPGPMC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



---

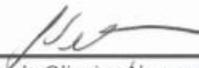
Prof(a). Dr(a). Jamil Assereuy Filho  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



---

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



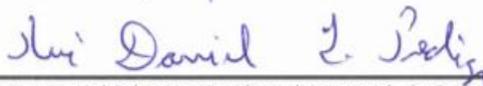
---

Dr(a) Lucas de Oliveira Álvares (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)



---

Dr(a) Marcelo Giachero (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr(a) Rui Daniel Schroder Prediger (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 17 de fevereiro de 2017.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial ao meu pai Ozilde, pois se não fosse pelo apoio incondicional que me proporcionaram apesar de todas as dúvidas e dificuldades, eu não teria concluído esta etapa.

Ao professor Dr. Leandro José Bertoglio, por ter me acolhido em seu laboratório e me orientado durante esses anos. Pelos ensinamentos e dedicação que proporcionaram meu crescimento científico.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia que contribuíram para a minha formação. Aos funcionários do LAMEB, pela ajuda e pelo suporte técnico.

Aos colegas de laboratório que estiveram presentes durante a realização desse trabalho: Fer Marin, Marina, Ana, Rafael, Bárbara, Jaque, Hugo, Rebecca, Felipe e Karol.

À Dra. Máira Assunção Bicca pela ajuda, pelos ensinamentos técnicos, pela alegria compartilhada e palavras de apoio.

A todos os amigos, dentro e fora do programa de pós-graduação, que estiveram presentes de longe ou de perto, e que foram de fundamental importância na superação das dificuldades dessa jornada. Em especial ao Yuri, à Nani e à Isa. À minha irmã Fabiana. Ao Guilherme, que com seu amor, suporte e dedicação me ajudou a concluir essa etapa.

Aos professores doutores Lucas de Oliveira Alvares, Rui Daniel Schroder Prediger, Marcelo Giachero e Antônio de Pádua Carobrez, por aceitarem compor a banca e colaborar na discussão e aperfeiçoamento deste trabalho.

À CAPES, ao CNPQ e à IBRO pelo apoio financeiro.



*“But you know, happiness can be found even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light.”*

(JK Rowling)



## RESUMO

O núcleo reuniens (NR) é o maior dos núcleos da linha média do tálamo. Seu perfil de conectividade neuronal e funcional com regiões cruciais para o processamento cognitivo e mnemônico, como o hipocampo (HPC), o córtex pré-frontal (CPF), e a amígdala o colocam em posição ideal para a participação na consolidação de memórias. Assim, o objetivo principal do presente estudo foi investigar a participação do NR na consolidação de memórias aversivas induzidas pelo protocolo de condicionamento de medo contextual (CMC). Para tanto, ratos Wistar submetidos à cirurgia estereotáxica e ao CMC tiveram o NR temporariamente inativado através da injeção local de muscimol (4 nmol/ 0,2 µL). Os níveis de congelamento mantiveram-se inalterados em relação ao grupo controle na reexposição ao contexto pareado, porém foram significativamente maiores durante a exposição ao contexto não pareado (Teste B), sugerindo a generalização do traço mnemônico. O mesmo foi observado quando os animais foram expostos ao contexto não pareado 22 dias após o condicionamento. Porém, no contexto A, 21 dias depois, foi observada uma porcentagem de tempo de congelamento significativamente maior no grupo muscimol em relação ao grupo controle, sugerindo uma persistência aumentada do traço de memória. O número de células Arc<sup>+</sup>, um indicativo de plasticidade sináptica, não mudou nas regiões pré-límbica do CPFm e basolateral da amígdala após a inativação do NR. No entanto, as células Arc<sup>+</sup> sofreram um aumento na região CA1 dorsal do HPC e um decréscimo na região CA1 ventral. Ainda, os animais que tiveram o NR inativado após o condicionamento apresentaram dificuldades de extinção e resistência à interferência farmacológica com clonidina (0,3mg/kg) após uma sessão de reativação do traço mnemônico, em relação aos respectivos grupos controle. A inatividade do NR durante a consolidação não alterou os comportamentos de esquivas e locomoção dos animais no labirinto em cruz elevado (LCE). A estimulação do NR pela ativação de receptores glutamatérgicos através da injeção local de NMDA (100 pmol/ 0,2 µL) durante a consolidação foi capaz de impedir a generalização causada pela ioimbina (2 mg/kg) e, após a reconsolidação, de resgatar a

especificidade contextual perdida após uma injeção de ioimbina durante a consolidação da memória. Estes resultados indicam que o NR participa da consolidação de memórias aversivas, influenciando suas características, possivelmente através do controle da plasticidade sináptica nas regiões dorsal e ventral do hipocampo.

**PALAVRAS-CHAVE:** núcleo reuniens, consolidação da memória, generalização do medo, persistência da memória, extinção.

## ABSTRACT

Nucleus reuniens (NR) is the major nucleus of the midline thalamus. Its profile of neuronal and functional connectivity with brain regions which are important for mnemonic processing, such as the hippocampus, the prefrontal cortex, and amygdala, provides NR with a possible crucial position to participate in memory consolidation. Therefore, this study intended to investigate NR's role in the consolidation of aversive memories induced by contextual fear conditioning (CFC). Wistar rats went through stereotaxic surgery and after CFC had the NR temporarily inactivated by a local injection of muscimol (MUS - 4 nmol/ 0.2  $\mu$ L). Freezing levels remained unaltered in the MUS group when compared to the control group during reexposure to the paired context (Test A), but were significantly higher during MUS-rats exposure to an unpaired context (Test B), what suggests the generalization of the mnemonic trace. The same behavioral pattern could be observed when rats were exposed to the unpaired context 22 days after CFC. However, when they were exposed to the paired context the day before, MUS-rats showed significantly higher freezing time than the control group, which indicates an increased persistence of the fear memory. MUS-rats have also shown an increase in Arc<sup>+</sup> cells in dorsal CA1, an indication of augmented synaptic plasticity in this region after NR inactivation during memory consolidation. In the ventral CA1 region, there was a decrease in Arc<sup>+</sup> cells. MUS-rats have also shown extinction deficits and resistance to pharmacological interference with clonidine (0.3 mg/kg) after a reactivation session, indicating a labilization deficit. NE inactivity did not induce changes in avoidance and locomotion behaviors in the elevated plus maze. Its stimulation by the activation of glutamatergic receptors through an NMDA injection (100 pmol/ 0.2  $\mu$ L) during consolidation and reconsolidation was able to prevent and rescue, respectively, the loss of contextual specificity induced by a yohimbine injection after conditioning. Altogether, present results suggest that the NR activity regulates keys features of a fear memory, probably by influencing hippocampal synaptic plasticity.

**KEY-WORDS:** nucleus reuniens, memory consolidation, fear generalization, memory persistence, extinction.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática das etapas de formação das memórias de longa duração.....	17
<b>Figura 2.</b> Após o processo de consolidação inicial, a memória pode voltar para um estado de labilidade ao ser reativada e evocada.....	20
<b>Figura 3.</b> Condicionamento de medo contextual em laboratório.....	23
<b>Figura 4.</b> Generalização da resposta de medo como observada em laboratório.....	24
<b>Figura 5.</b> Posicionamento do núcleo reuniens do tálamo em relação ao terceiro ventrículo e aos núcleos paraventricular e romboide, em cérebros de roedores.....	29
<b>Figura 6.</b> Imagem representativa do sítio de infusão considerado como correto para a histologia do NR .....	40
<b>Figura 7.</b> Protocolo básico de condicionamento de medo contextual utilizado neste trabalho.....	42
<b>Figura 8.</b> A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo imediatamente, mas não 6h, após a aquisição de uma memória aversiva aumenta a expressão de congelamento em um contexto não pareado...	50
<b>Figura 9.</b> A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo logo após a aquisição de uma memória aversiva aumenta a expressão de congelamento em um contexto não pareado 21 dias após o condicionamento, assim como a persistência da expressão de medo no contexto pareado.....	52
<b>Figura 10.</b> Em uma memória aversiva recente induzida por um treino de menor intensidade, a inativação do NR aumenta a expressão de congelamento em um contexto não pareado, mas não no contexto pareado.....	54

<b>Figura 11.</b> Em uma memória remota induzida por um treino de menor intensidade, a inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo provoca um aumento da persistência e aumento da expressão de congelamento em um contexto não pareado.....	56
<b>Figura 12.</b> A inativação do NR após a aquisição da memória aversiva não afeta o comportamento tipo-ansioso e a atividade exploratória no labirinto em cruz elevado.....	59
<b>Figura 13.</b> Quando inativado após o condicionamento aversivo precedido imediatamente pela etapa de familiarização, o NR parece não influenciar a consolidação da memória aversiva .....	62
<b>Figura 14.</b> A memória consolidada após a inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo apresenta um déficit de extinção.....	65
<b>Figura 15.</b> A memória consolidada após a inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo é resistente ao efeito de um bloqueador de reconsolidação.....	68
<b>Figura 16.</b> Quando não reativada, a memória não é suscetível à interferência farmacológica.....	69
<b>Figura 17.</b> Imagens representativas da imunomarcção para Arc nas 4 regiões encefálicas estudadas.....	72
<b>Figura 18.</b> Análise quantitativa da imunorreatividade para Arc nas diferentes regiões encefálicas estudadas.....	74
<b>Figura 19.</b> A ativação dos receptores NMDA do núcleo reuniens (NR) do tálamo após a aquisição é capaz de prevenir a expressão generalizada de medo provocada pela administração sistêmica de ioimbina.....	77
<b>Figura 20.</b> A ativação dos receptores NMDA do núcleo reuniens (NR) do tálamo após a reativação é capaz de resgatar a especificidade de uma	

memória de medo cuja expressão generalizada foi induzida pela  
hiperatividade adrenérgica durante sua consolidação.....79



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**µl:** microlitro

**Arc/Arg3.1:** *activity-regulated cytoskeleton-associated protein*  
(proteína associada ao citoesqueleto regulada por atividade)

**ANOVA:** análise de variância

**BLA:** porção basolateral da amígdala

**BSA:** *bovine serum protein* (soro albumina bovina)

**CA1, 2 e 3:** *cornu ammonis* 1, 2 ou 3 (sub-regiões hipocampais)

**CLO:** clonidina

**cm:** centímetro

**CMC:** condicionamento de medo contextual

**CPF:** córtex pré-frontal

**CPFm:** córtex pré-frontal medial

**DAB:** tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina

**EBA:** entradas nos braços abertos

**EBF:** entradas nos braços fechados

**EPM:** erro padrão da média

**g:** gramas

**G:** gauge

**GABA:** *gamma-aminobutyric acid* (ácido gama-aminobutírico)

**h:** horas

**HPC:** hipocampo

**IEGs:** *immediate early genes* (genes de expressão imediata)

**IOI:** ioimbina

**kg:** quilograma

**LCE:** labirinto em cruz elevado

**LTP:** *long-term potentiation* (potenciação de longo prazo)

**mA:** miliamperes

**mg:** miligramas

**ml:** mililitros

**mm:** milímetros

**MUS:** muscimol

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**nmol:** nanomol

**NR:** núcleo reuniens

**PAR:** posturas de avaliação de risco

**PBS:** *phosphate-buffered saline* (tampão fosfato-salina)

**s:** segundos

**TBS:** *tris-buffered saline* (tampão tris-salina)

**TEPT:** transtorno de estresse pós-traumático

**VEI:** veículo

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Uma breve revisão sobre a memória, suas características e etapas .....	14
1.2. O estudo das memórias associativas de medo.....	22
1.3. Neurobiologia da memória e o núcleo reuniens do tálamo.....	24
2. HIPÓTESE.....	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo geral.....	33
3.2. Objetivos específicos .....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Animais .....	35
4.2. Drogas .....	35
4.3. Cirurgia estereotáxica.....	36
4.4. Procedimento de microinjeção central .....	38
4.5. Histologia.....	38
4.6. Condicionamento de medo contextual .....	40
4.7. Labirinto em cruz elevado.....	44
4.8. Imunohistoquímica.....	45
4.8.1. Perfusão intracardíaca e preparação do tecido cerebral .....	45
4.8.2. Reação imunoistoquímica para Arc .....	46
4.8.3. Regiões de interesse e quantificação de células Arc <sup>+</sup> .....	47
4.9. Análise estatística.....	48
5. RESULTADOS.....	49

5.1. Efeitos da inativação temporária do núcleo reuniens do tálamo (NR) após o condicionamento nos níveis de congelamento expresso nos contextos pareado e não pareado em memórias aversivas .....	49
5.2. Efeitos da inativação temporária do núcleo reuniens do tálamo (NR) após o condicionamento nos níveis de congelamento expresso nos contextos pareado e não pareado em memórias aversivas adquiridas após um estímulo de menor intensidade .....	53
5.3. Efeitos da inativação temporária do núcleo reuniens do tálamo (NR) após o condicionamento sobre o comportamento tipo ansioso e a atividade exploratória geral no labirinto em cruz elevado.....	57
5.4. Efeitos da inativação temporária do núcleo reuniens do tálamo (NR) após uma sessão de condicionamento precedida imediatamente pela familiarização ao contexto.....	60
5.5. Efeitos da inativação temporária do núcleo reuniens do tálamo (NR) após o condicionamento sobre a posterior extinção da memória aversiva .....	62
5.6. Efeitos da inativação temporária do núcleo reuniens do tálamo (NR) após o condicionamento sobre a posterior labilização e possibilidade de interferência durante a reconsolidação da memória aversiva.....	66
5.7. Efeitos da inativação temporária do núcleo reuniens do tálamo (NR) após o condicionamento sobre a expressão de Arc no córtex pré-límbico, amígdala basolateral e região CA1 das porções ventral e dorsal do HPC .....	70
5.8. Efeitos da ativação de receptores NMDA do núcleo reuniens do tálamo (NR) durante a consolidação e a	

reconsolidação de uma memória aversiva consolidada sob a influência de hiperatividade adrenérgica sistêmica .....	75
6. DISCUSSÃO.....	81
7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
8. REFERÊNCIAS.....	93



## 1. INTRODUÇÃO

Memória é o mecanismo pelo qual os indivíduos são capazes de adquirir, reter e lembrar-se de informações sobre experiências pelas quais passaram. O termo “engrama” foi utilizado pela primeira vez pelo biólogo alemão Richard Semon em 1904, para descrever o armazenamento físico de uma memória no sistema nervoso central. A busca por entender o armazenamento de memórias no cérebro culminou, recentemente, no delineamento da hipótese de alocação das memórias: um processo pelo qual circuitos neuronais seriam recrutados para suportar e armazenar memórias específicas. Este processo seria dependente, dentre outras coisas, do tipo de experiência que gerou a memória em questão (KHALAF; GRÄFF, 2016). Todo engrama possui o potencial à euforia, que pode ser definida de forma simplificada como sua capacidade de ser lembrado e expresso comportamentalmente através da evocação provocada por pistas relacionadas (SCHACTER, 2012). Dessa forma, a alocação do engrama e sua consolidação podem influenciar sua posterior evocação e expressão comportamental. Memórias de grande valência emocional negativa, por exemplo, podem recrutar circuitos neuronais em regiões diferentes daquelas memórias neutras ou positivas, e a resposta comportamental decorrente do aprendizado seria diferente (ROZESKE et al., 2015). Considerando esse cenário, determinar o recrutamento e o papel de estruturas encefálicas no processamento de memórias aversivas para então tentar modulá-las e reverter os efeitos deletérios que podem ocasionar transtornos psiquiátricos é uma tarefa que ganha importância.

## 1.1. Uma breve revisão sobre a memória, suas características e etapas

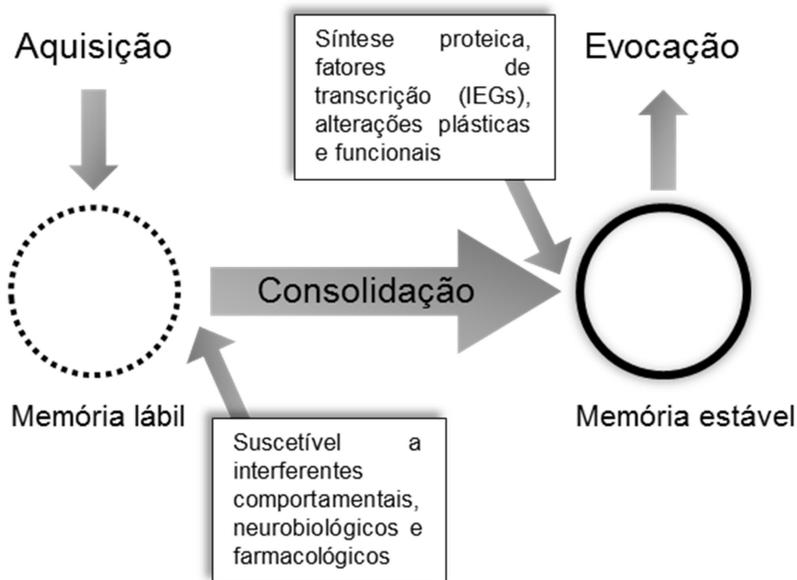
A princípio tomou-se como verdade que as memórias, após um período de susceptibilidade a interferentes denominado *janela de consolidação*, se tornavam estáveis e não poderiam mais ser modificadas (MÜLLER; PILZECKER, 1900; LECHNER et al., 1999). Donald Hebb propôs, na década de 40, a hipótese da potenciação sináptica, que fundamentaria a descoberta da LTP (do inglês *Long-Term Potentiation*), considerada fundamental no armazenamento neuronal de informações e base da formação de memórias. A hipótese da potenciação sináptica propõe que um neurônio pré-sináptico seria capaz de estimular de forma específica um neurônio pós-sináptico, gerando modificações estruturais e moleculares que estão ligadas à retenção da informação (HEBB, 1949). Essa hipótese foi confirmada experimentalmente por Bliss e Lømo em 1973, que demonstraram um aumento sustentado na eficiência sináptica em células granulares do giro denteado de coelhos anestesiados após estimulação elétrica repetida da via perforante (BLISS; LOMO, 1973). Nos anos que se seguiram, com o desenvolvimento de técnicas específicas, uma série de estudos confirmou estes achados e desvendou ocorrências nos níveis molecular, celular e sistêmico que levariam por fim à estabilização do traço de memória, que antes disso seria suscetível a interferentes comportamentais e farmacológicos (DUDAI, 2002; 2012).

O processo de consolidação pode ser dividido, para fins didáticos, em consolidação sináptica ou celular e consolidação sistêmica. A consolidação sináptica refere-se à ativação de cascatas de

sinalização intracelular após um estímulo que leva à modulação da expressão gênica de forma a alterar a produção proteica e, por fim, a eficiência sináptica (DUDAI, 2012). Dentre os componentes celulares modulados pela experiência de aprendizado estão os genes de expressão imediata, ou do inglês IEGs (*Immediate early genes*), e proteínas que atuam no aumento da eficiência sináptica dos neurônios envolvidos. Dentre os IEGs, temos o Arc/Arg3.1, cuja expressão está intimamente ligada à ativação de receptores NMDA pelo glutamato, um processo conhecido como fundamental para a LTP e a remodelação sináptica que resulta no armazenamento de informações a longo prazo (ABRAHAM; WILLIAMS, 2008; LÜSCHER; MALENKA, 2012). A expressão de Arc é, portanto, utilizada como um marcador de plasticidade sináptica no cérebro (KUBIK et al., 2012; NAKAYAMA et al., 2016). Arc tem sido estudada também como um componente molecular do controle de homeostase e força sináptica que participa da manutenção de memórias em longo prazo (BRAMHAM, 2008; KORB; FINKBEINER, 2011; KAWASHIMA et al., 2014; LI et al., 2015).

Já a consolidação sistêmica pode ser definida como um processo dinâmico de armazenamento de informações no sistema nervoso central que ocorre através de adaptações em redes neuronais de diferentes regiões encefálicas após um aprendizado (SQUIRE; ALVAREZ, 1995; DUDAI; MORRIS, 2000; 2013). Esta reorganização pode levar horas, dias, semanas, meses ou anos (DUDAI, 2002). De forma clássica se considera que a consolidação sistêmica envolve a transferência gradual de informações entre o hipocampo (HPC) e o córtex pré-frontal (CPF) após a aquisição, levando ao armazenamento

da informação por longos períodos ou até pela vida inteira do indivíduo. Através dessa transferência gradual, a memória naturalmente adquire características mais abstratas e menos específicas (*gist memory*), decorrentes das características funcionais do CPF (SQUIRE et al., 2015). A velocidade e outras características da consolidação sistêmica podem sofrer interferência do estresse (PEDRAZA et al., 2016), de aprendizados prévios (TSE et al., 2007; VAN KESTEREN, 2010) e posteriores à aquisição (HAUBRICH et al., 2016). De outro ponto de vista, a teoria dos múltiplos traços apresenta a ideia de que memórias elaboradas sempre requerem o recrutamento de diversas regiões cerebrais, tendo representações com características diferentes em várias delas, como o HPC, o CPFm e a amígdala, desde sua aquisição (WANG et al., 2006; TSE et al., 2007).



**Figura 1. Representação esquemática das primeiras etapas de formação das memórias.** A partir do momento da sua aquisição e até algumas horas depois (janela de consolidação), a memória é lábil e suscetível a interferentes, sendo necessária sua consolidação para que esta se torne estável e possa ser evocada posteriormente.

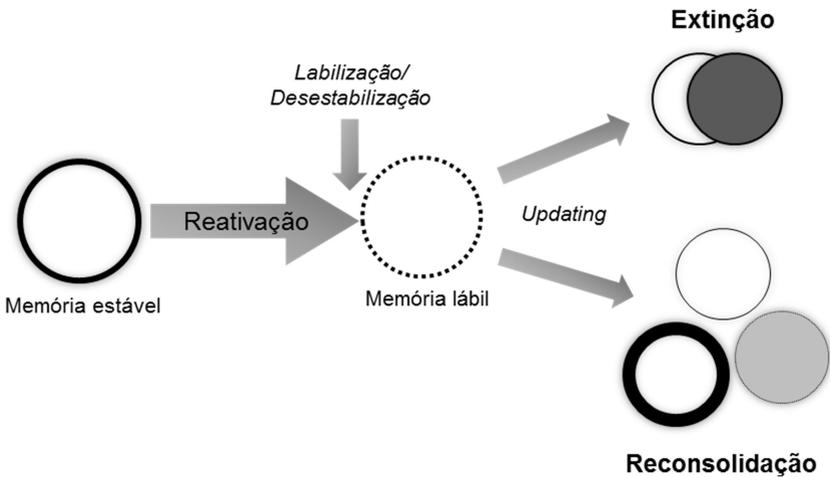
Na década de 1960, o conceito de consolidação como um processo estabilizador irreversível e que tornaria as memórias imutáveis começou a ser questionado (MISANIN, 1968) e passou por uma revisão importante com os trabalhos de Susan Sara e Karim Nader em meados de 2000 (PRZYBYSLAWSKI; SARA, 1997; NADER et al., 2000a, 2000b; SARA, 2000a, 2000b). Estes trabalhos trouxeram a reconsolidação à tona, mostrando que uma memória pode ser modificada mesmo após sua consolidação. Assim surgiu a possibilidade terapêutica e experimental de interferir em memórias horas, dias e até anos após sua consolidação inicial. Processos onde o conteúdo ou

expressão comportamental da memória original são modificados por novas experiências, interferências farmacológicas ou manipulação neurobiológica podem ser chamados de *updating* (atualização) da memória (FINNIE; NADER, 2012). Dessa forma, a memória original é atualizada de forma a conter ou associar-se à novas informações e, muito possivelmente, sua evocação provoca um efeito comportamental diferente daquele da memória original (WINTERS et al., 2009).

O processo de extinção é uma forma de aprendizado associativo na qual a apresentação repetida e/ou prolongada do estímulo condicionado na ausência do estímulo incondicionado reduz a expressão da resposta condicionada. Foi Pavlov quem primeiro descreveu esse fenômeno de aprendizado, ao observar que seus cães salivavam menos após a apresentação repetida do sinal indicativo de que receberiam alimento sem na verdade recebê-lo (PAVLOV, 1927). O processo de extinção age sobre a memória original (sem a “apagar” (RESCORLA; HETH, 1975; CORCORAN; MAREN, 2004)), inibindo ou modificando sua expressão por realizar um *updating* associativo, de tal forma que o estímulo condicionado passa a não mais remeter ao estímulo incondicionado, uma vez que o indivíduo aprende a suprimir essa associação (BOUTON, 1993; CAREAGA et al., 2016). É digno de nota que os processos de reconsolidação e extinção de memórias possuem muitas semelhanças, sendo ambos desencadeados pela evocação e reativação do traço. Uma das principais diferenças entre o desencadeamento do processo de reconsolidação ou de extinção de uma memória parece ser a duração do estímulo que leva à reativação (PEDREIRA; MALDONADO, 2003; SUZUKI et al., 2004; POWER et al., 2006). Uma exposição mais prolongada levaria à extinção da

resposta comportamental associada à memória original, o que constitui um novo aprendizado que também passa pela etapa de consolidação e, assim como a reconsolidação (NADER et al., 2000a), é suscetível à interferências. Merlo e colaboradores (2014) demonstraram também que os processos de reconsolidação e extinção possuem mecanismos moleculares diferentes entre si, porém complementares, através da manipulação quantitativa e qualitativa das pistas contextuais durante as reexposições.

Um processo essencial para a ocorrência tanto da reconsolidação quanto da extinção de uma memória é a labilização do traço mnemônico (LEWIS, 1979; BEN MAMOU et al., 2006). A labilização é um processo de desestabilização da memória original, permitindo que esta seja modificada ou atualizada (DE OLIVEIRA ALVARES et al., 2013), e está ligada à degradação proteica após a reativação do traço mnemônico (LEE et al., 2008). Enquanto que a aquisição inicial de uma memória e sua posterior consolidação sempre envolvem um período de labilidade, o mesmo não acontece sempre após sua reativação. Wang e colaboradores (2009) demonstraram que uma memória formada por um treino intenso, por exemplo, pode ser resistente à interferência sob condições que geralmente propiciariam o *updating* de memórias menos intensas, o que pode dever-se a sua maior resistência ao processo de labilização induzido por reativação. Outros fatores, como a idade da memória, a quantidade e qualidade das pistas que levam à sua reativação e o número de reativações subsequentes também podem interferir na capacidade de labilização de uma memória (ALBERINI, 2005).



**Figura 2.** Após o processo de consolidação inicial, a memória pode voltar a um estado de labilidade ao ser evocada e reativada. Uma vez lábil esta memória pode passar pelo processo de extinção, onde uma nova memória é formada, de forma associada à memória original, suprimindo em parte ou totalmente a sua resposta comportamental; ou reconsolidação, onde a memória original pode ser reforçada, enfraquecida ou modificada de forma a incluir novas informações.

A generalização é um processo adaptativo altamente conservado entre as espécies, sendo definida como a associação e expressão de respostas comportamentais relacionadas a determinado estímulo ou contexto em resposta a estímulos e contextos que são diferentes, porém semelhantes àqueles presentes na memória original (SHEPARD, 1987; DUDAI, 2005). O termo “generalização” foi utilizado pela primeira vez em 1946 por Lashley e Wade, mas Pavlov já havia descrito o mesmo processo durante suas observações em 1927, quando notou que a salivação dos cães em resposta a um estímulo sonoro poderia ser provocada também por estímulos sonoros de outras frequências que nunca haviam sido associados ao recebimento de

alimento. Mais tarde, em um estudo com pombos e suas respostas a estímulos visuais, Guttman e Kalish (1956) demonstraram que os animais apresentavam uma gradiente de generalização, na qual a resposta comportamental era expressa de forma relativamente independente da capacidade de distinção sensorial entre as pistas apresentadas, sugerindo que a generalização não é uma mera falha de discriminação sensorial de estímulos. Em 2015, Onat e Büchel corroboraram as conclusões de Guttman e Lakish utilizando estudos de imagem em seres humanos e mostrando que a generalização é um processo ativo que independe da discriminação sensorial correta ou incorreta do estímulo e depende, por outro lado, da ação orquestrada de diversas regiões encefálicas em um sistema de decisão complexo baseado em ambiguidade e incerteza.

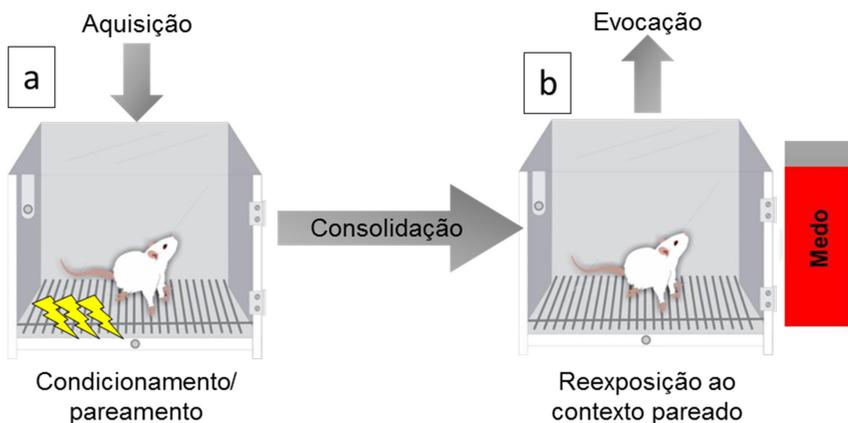
A generalização também pode ser observada como um fenômeno temporal, provavelmente ligado à consolidação sistêmica do traço mnemônico. Dessa forma, o traço mnemônico seria “transferido” com o passar do tempo do HPC, que funcionaria como um armazenamento temporário para memórias com alta especificidade contextual, para o CPFm, que funcionaria como um armazenamento de memórias a longo-prazo com características diferentes, como uma menor especificidade contextual (WINOCUR et al., 2007; GOSHEN et al., 2011). Então, quando o traço de memória é expresso ou reativado de forma remota, ou seja, vários dias, meses ou anos após sua aquisição, ele depende mais do suporte cortical do que do hipocampal, o que se traduz em sua generalização (WILTGEN et al., 2007; 2010; WINOCUR et al., 2009).

## 1.2. O estudo das memórias associativas de medo

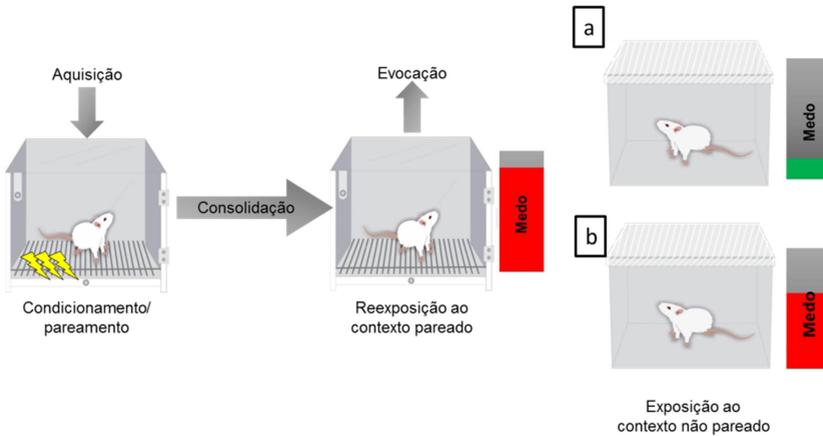
O aprendizado de medo é um processo adaptativo que permite ao indivíduo adquirir informações importantes sobre pistas e contextos envolvidos em situações de perigo, de forma que essas informações possam ser evocadas e utilizadas na produção de uma resposta comportamental apropriada.

O condicionamento clássico, primeiramente descrito por Ivan Pavlov, consiste no pareamento de um estímulo neutro com um estímulo saliente, alterando a valência do estímulo neutro até que, exposto unicamente ao primeiro, o indivíduo passe a expressar respostas que seriam justificadas somente frente ao estímulo saliente, indicando uma associação entre essas informações (PAVLOV, 1927). Muito embora Pavlov tenha utilizado estímulos apetitivos para seu experimento mais famoso em cães, o condicionamento de medo também parte desse princípio: o indivíduo aprende que certas pistas e estímulos (condicionados) são preditores de eventos aversivos (estímulos incondicionados). É uma forma básica de aprendizado altamente conservada na escala evolutiva, sendo uma ferramenta fundamental no estudo da neurobiologia e dos mecanismos celulares que suportam os processos mnemônicos em animais e seres humanos (FANSELOW, 1994; FENDT; FANSELOW, 1999). Além disso, o condicionamento de medo contextual é extremamente útil porque envolve tanto os fatores cognitivos e mnemônicos quanto os fatores emocionais do aprendizado. Dessa forma, é possível estudar o aprendizado de medo em uma quase infinidade de abordagens e pontos de vista (LEDOUX, 2009). De forma geral, são utilizados choques elétricos nas patas como estímulo

incondicionado que acaba por gerar respostas frente ao estímulo condicionado (no nosso caso, o contexto), muito embora outros estímulos também tenham sido descritos na literatura, como odor de predadores e estímulos palatáveis (BLANCHARD et al., 2001; GUITTON; DUDAI, 2004). A resposta comportamental mais mensurada para averiguar o aprendizado nesses casos é a imobilidade ou “congelamento” frente à apresentação do estímulo “neutro” após o pareamento, uma resposta inata de medo em roedores (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969).



**Figura 3. Condicionamento de medo contextual em laboratório.** O contexto é o estímulo previamente neutro que, ao ser pareado ao choque nas patas como estímulo incondicionado durante a sessão de condicionamento (a) passa a evocar respostas de medo mesmo sem a presença do estímulo incondicionado durante a reexposição (b).



**Figura 4. Generalização da resposta de medo como observada em laboratório.** Após o condicionamento, a expressão de medo (como congelamento) durante a reexposição ao contexto pareado é esperada, enquanto que quando exposto a um contexto diferenciado e não pareado, a resposta esperada do animal é um comportamento de exploração e não a expressão de comportamentos de medo (a). A generalização ocorre quando o animal passa a expressar níveis elevados de congelamento em resposta à exposição a um contexto não pareado ao estímulo incondicionado (b).

### 1.3. Neurobiologia da memória e o núcleo reuniens do tálamo

Apesar de organizado em diversas áreas com funções relativamente específicas, o cérebro não funciona como um órgão fragmentado. A atividade encefálica geralmente ocorre através da ação coordenada e integrada de diversas regiões, gerando assim o comportamento do indivíduo. Dessa forma, é natural a conclusão de que as características desses comportamentos frente a diversas situações, e de especial importância para este trabalho, às situações aversivas, podem mudar conforme as regiões envolvidas e o tipo de atividade entre elas.

Dentre todas as áreas envolvidas no processamento de memórias, o hipocampo provavelmente é a mais estudada. Desde a descrição do caso do paciente H.M. no final da década de 60, esta região do lobo temporal tem passado por um escrutínio de suas funções cognitivas e mnemônicas (MILNER, 1968). Organizada em sub-regiões distintas, que incluem o giro denteado, CA1, CA2 e CA3, em primatas (incluindo os seres humanos) essa região possui uma diferenciação através do eixo longitudinal do encéfalo, da sua região anterior até a sua região posterior, sendo estas anatômica e funcionalmente distintas, com diferenças na expressão gênica e em suas conectividades funcionais e exercendo funções fisiológicas e comportamentais distintas e complementares. Em roedores, existe uma diferenciação homóloga entre as regiões do hipocampo, sendo estas separadas em região dorsal e região ventral (SWANSON; COWAN, 1977; MOSER; MOSER, 1998). A região dorsal do hipocampo, em geral, é relacionada à memória espacial. Testes mnemônicos clássicos utilizando o labirinto aquático de Morris e o labirinto radial de oito braços demonstram que o hipocampo dorsal é necessário para o aprendizado espacial, enquanto que lesões restritas ao hipocampo ventral não causam nenhum tipo de prejuízo nessas tarefas e, no caso do labirinto radial, aumentam a procura pelos braços associados ao alimento, sugerindo uma modificação apenas nos aspectos afetivos da tarefa (MOSER et al., 1995; POTHUIZEN et al., 2004). Assim, a região ventral do hipocampo parece estar relacionada ao processamento de emoções. Lesões restritas à porção ventral do hipocampo de roedores aumentam o número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado e diminuem a liberação de

corticosterona em animais submetidos a estresse (KJELSTRUP, 2004). No condicionamento de medo contextual, uma tarefa que envolve tanto o processamento espacial e de pistas quanto emocional, a distinção entre as funções das regiões dorsal e ventral do hipocampo é menos clara. Muito embora lesões, inativações e bloqueio de síntese proteica na porção dorsal tenham um efeito bastante claro no processamento de uma memória contextual, as mesmas manipulações realizadas na porção ventral do hipocampo parecem ter efeitos mais complexos e dependentes do tipo específico de tarefa utilizada em cada estudo (ZHANG et al., 2001; MAREN; HOLT, 2004; RUDY; MATUS-AMAT, 2005; HUNSAKER; KESNER, 2008).

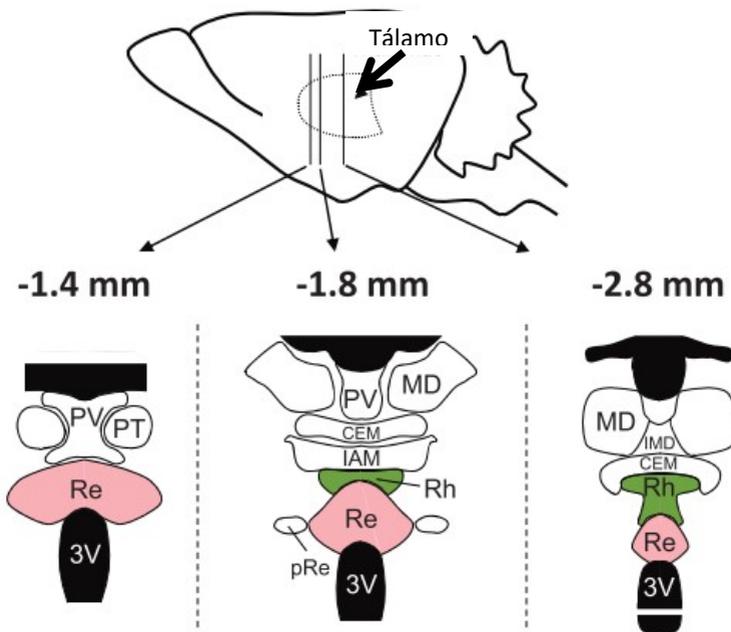
Outra região intimamente relacionada com o processamento cognitivo superior, aprendizado associativo e memória é o córtex pré-frontal medial (CPFm). O CPFm está relacionado também a regulação emocional (PITMAN et al, 2012) e a tomada de decisões (EUSTON et al., 2012; WOOD et al., 2012). Suas três sub-regiões: o córtex cingulado anterior, o córtex pré-límbico e o córtex infralímbico, conectam-se tanto com a amígdala (VERTES, 2004) quanto com a região CA1 do hipocampo, via núcleo reuniens (VERTES et al., 2015). O envolvimento do córtex pré-frontal foi demonstrado nas fases de aquisição, consolidação, reconsolidação e expressão de memórias de medo (ROZESKE et al, 2014, STERN et al., 2014), assim como na sua generalização e extinção (ROZESKE et al., 2014; VANVOSSSEN et al., 2017). Em seres humanos, uma maior ativação do CPFm foi negativamente correlacionada a ativação da amígdala durante o condicionamento de medo contextual, o que indicaria um papel inibitório dessa região sobre respostas de medo (ALVAREZ et al.,

2008). Em acordo com a teoria da consolidação sistêmica, demonstrou-se que durante a reativação de uma memória contextual remota, a expressão de c-Fos e zif268, dois IEGs associados à ativação neuronal e reativação de engramas, respectivamente, encontravam-se aumentados no CPFm e diminuídos na região CA1 do hipocampo dorsal (FRANKLAND et al., 2004; GOSHEN et al., 2011). Outro estudo envolvendo lesões em animais demonstrou que o CPFm está envolvido na aquisição de representações contextuais precisas em um protocolo de CMC (ANTONIADIS; MCDONALD, 2006).

O núcleo reuniens do tálamo (NR) é o maior núcleo da linha média dessa estrutura. Embora ainda não haja um consenso, as evidências indicam que o NR está envolvido em comportamentos que dependem do CPFm e da interação entre o HPC e o CPFm (VERTES et al., 2015). Quanto à sua conectividade, o NR recebe densa inervação dos córtices pré-límbico, infralímbico e anterior cingulado e do subículo e da região CA1 do HPC, mas não do giro denteado e das regiões CA2 e CA3. Herkenham demonstrou em 1978 que o NR é a maior fonte talâmica de aferentes ao hipocampo. O CPFm também recebe densas projeções vindas do NR, principalmente os córtices pré- e infralímbico. Já no HPC, o NR projeta-se unicamente para as regiões CA1 dorsal e ventral, muito embora em maior quantidade (até 10 vezes mais) para a região ventral (WOUTERLOOD, 1990; VERTES, 2002; MCKENNA; VERTES, 2004; VERTES, 2015). De 3 a 9% dos neurônios do NR projetam-se bilateralmente tanto para o HPC quanto para o CPFm e ele é considerado a rota principal de transferência de informações do CPFm para o HPC (HOOVER; VERTES, 2012; VARELA et al., 2014).

As fibras provenientes do CPFm formam sinapses excitatórias nos dendritos proximais dos neurônios do NR que projetam-se ao hipocampo (VERTES et al., 2007), e as fibras que projetam-se do NR para o CPFm também são excitatórias (DI PRISCO; VERTES, 2006). Quanto ao HPC, as fibras que se projetam do NR podem exercer ações tanto excitatórias quanto inibitórias, ao formar sinapses excitatórias tanto com células piramidais quanto com interneurônios gabaérgicos, o que sugere uma função de modulação da atividade neuronal na região CA1 (DOLLEMAN-VAN DER WEEL et al., 1997). Quando comparados aos efeitos das projeções advindas da região CA3 do HPC sobre a região CA1, a ação excitatória das fibras provenientes do NR sobre essa região mostrou-se mais pronunciada, produzindo facilitação sináptica e induzindo LTP, o que demonstra o controle do NR sobre a plasticidade sináptica no HPC (BERTRAM; ZHANG, 1999; MORALES et al., 2007).

Uma série de estudos tem implicado o NR no processamento de memórias de trabalho (HEMBROOK; MAIR, 2001, HEMBROOK et al., 2012; HALLOCK et al., 2013), memórias espaciais (DOLLEMAN-VAN DER WEEL et al., 2009; CHOLVIN et al., 2013) e sua persistência (LOUREIRO et al., 2012), impulsividade (PRASAD et al., 2013), flexibilidade comportamental e estratégia (CHOLVIN et al., 2013) e aquisição precisa da memória contextual (XU; SÜDHOF, 2013). No entanto, nenhum trabalho estudou o papel do NR na consolidação de memórias aversivas. Na grande maioria dos casos, apenas as tarefas que dependem da atividade orquestrada entre HPC e CPFm parecem sofrer alterações com inativações ou lesões do NR (CASSEL; PEREIRA DE VASCONCELOS; 2015).



**Figura 5.** Posicionamento do núcleo reuniens do tálamo (Re) em relação ao terceiro ventrículo (3V) e aos núcleos paraventricular (PV) e romboide (Rh), em cérebros de roedores. (Adaptado de Cholvin et al., 2013)



## **2. HIPÓTESE**

De acordo com trabalhos prévios que demonstram a participação do núcleo reuniens do tálamo no processamento mnemônico e cognitivo e sabendo de sua conexão funcional com áreas importantes para a formação e o processamento de memórias aversivas, a hipótese deste trabalho é que o núcleo reuniens participa da consolidação dessas memórias e influencia suas características.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Investigar o papel do núcleo reuniens do tálamo na consolidação de uma memória de medo contextual.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a participação do núcleo reuniens do tálamo na consolidação de memórias aversivas através de sua inativação farmacológica;
- Caracterizar a participação do núcleo reuniens do tálamo no aprendizado associativo que subsidia a consolidação e persistência de memórias aversivas;
- Confirmar a relação entre a atividade do núcleo reuniens e a generalização de respostas de medo;
- Investigar a expressão de Arc no córtex pré-frontal medial, na amígdala e nas porções ventral e dorsal do hipocampo de

roedores durante a consolidação de uma memória aversiva após a inativação farmacológica do núcleo reuniens;

- Investigar se a ativação dos receptores NMDA do núcleo reuniens é capaz de prevenir a generalização do medo causada por hiperatividade adrenérgica sistêmica durante a consolidação
  
- Investigar se a ativação dos receptores NMDA do núcleo reuniens durante a reconsolidação é capaz de resgatar a especificidade contextual da memória de medo, perdida após a indução da hiperatividade adrenérgica sistêmica durante a consolidação.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Foram utilizados 250 ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, com 3 a 4 meses de idade e peso entre 250 e 350 g. Durante sua permanência no biotério, os animais foram alojados em gaiolas plásticas padrão (36 x 30 x 15 cm) contendo até 5 ratos cada. Eles tiveram água e comida *ad libitum* e a temperatura ambiente foi mantida em  $21 \pm 2$  °C, com ciclo de luz claro/escuro de 12 h com início às 07 h. Todos os procedimentos foram realizados mediante aprovação do comitê de ética para o uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (Ofício nº71/CEUA/PRPE/2012PP00766).

### 4.2. Drogas

**Muscimol** (MUS; 4,0 nmol / 0,2 µL; Sigma-Aldrich, EUA) foi dissolvida em PBS. O muscimol é uma ferramenta bem estabelecida na literatura, utilizada para induzir a inativação temporária de regiões encefálicas por meio da potencialização gabaérgica através de agonismo GABA<sub>A</sub>. A dose utilizada neste trabalho foi baseada em estudos prévios publicados pelo nosso laboratório (STERN et al., 2014).

**NMDA** (100 pmol / 0,2 µL; Sigma-Aldrich, EUA), dissolvida em PBS. Utilizado em trabalhos prévios como ferramenta farmacológica para estimulação glutamatérgica de regiões encefálicas (KINCHESKI et al., 2012; MOCHNY et al., 2013). A dose selecionada baseia-se em trabalhos prévios do laboratório (VANVOSSSEN et al., 2017).

**Cloridrato de ioimbina** (IOI; 2 mg/kg; Tocris, EUA), dissolvida em água destilada e administrada de forma sistêmica através de injeção intraperitoneal em um volume de 1,0 mL/kg. A dose utilizada baseia-se em trabalhos prévios do laboratório (GAZARINI et al., 2014; VANVOSSSEN et al., 2017). A ioimbina provoca um aumento da atividade noradrenérgica através do antagonismo de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos.

**Cloridrato de clonidina** (CLO; 0,3 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA), dissolvida em água destilada e administrada de forma sistêmica através de injeção intraperitoneal em um volume de 1,0 mL/kg. A dose utilizada baseia-se em trabalhos prévios do laboratório (GAZARINI et al., 2014; MARIN, 2017). A clonidina é um agonista de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos, reconhecida como agente amnésico e bloqueador da reconsolidação de memórias.

### 4.3. Cirurgia estereotáxica

Os animais foram primeiramente pesados e então receberam uma injeção intraperitoneal de quetamina (100 mg/ml/kg; Syntec Ltda., Brasil) e xilazina (10 mg/ml/kg; Syntec Ltda., Brasil) para anestesia. Após atingir plano anestésico adequado, os animais tiveram os pêlos do

topo da cabeça cortados e foram posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA) com o suporte de duas barras auriculares. A assepsia do campo cirúrgico foi realizada com solução de álcool iodado 2% e, posteriormente, uma solução anestésica de lidocaína 3% com adrenalina 1:50000 (Dentsply Pharmaceutical, Brasil) foi injetada por via subcutânea no local da incisão. Um corte longitudinal da pele acima do crânio permitiu a exposição e raspagem do periósteo para a exposição do crânio e das suturas lambdoide e coronal. Após perfuração com broca odontológica, dois parafusos de aço inoxidável foram afixados ao crânio do animal para oferecer suporte à prótese de acrílico posteriormente utilizada.

Uma cânula-guia de 15 mm confeccionada a partir de agulhas hipodérmicas (22G; 25,0 x 7,0 mm) foi implantada unilateralmente em ângulo de 15° nas coordenadas obtidas através de consulta ao atlas do cérebro de ratos Paxinos e Watson (2009) referentes ao núcleo reuniens do tálamo (1,92 mm posterior ao bregma, + 2,0 mm relativo ao eixo lateral e - 6,5 mm relativo ao eixo dorso-ventral; DAVOODI et al., 2011). Por fim, uma camada de acrílico odontológico auto-polimerizável de secagem rápida foi aplicada para cobrir toda a superfície exposta do crânio e afixar todas as peças em uma prótese sólida. O tratamento pós-operatório consistiu de uma injeção subcutânea de flunixin meglumina (2,5 mg/kg; Schering-Plough, Brasil), uma substância antipirética e antiinflamatória.

Após o término da cirurgia, os animais foram mantidos em uma cama aquecida por 30 minutos para diminuir o risco de hipotermia. Em seguida, foram levados ao biotério e mantidos em suas caixas-moradia

num número máximo de 4 animais por caixa por 5-7 dias para recuperação e posterior utilização experimental.

#### 4.4. Procedimento de microinjeção central

A microinjeção de drogas ou veículo no núcleo reuniens do tálamo foi executada através de agulhas com 15,5mm de comprimento confeccionadas a partir de agulhas gengivais (30G, 13mm) conectadas a um tubo de polietileno acoplado a uma microseringa (Hamilton, EUA) preenchida com água destilada. Uma bolha de ar foi interposta entre a água e a solução a ser injetada, de forma a facilitar a visualização do deslocamento da solução durante a infusão.

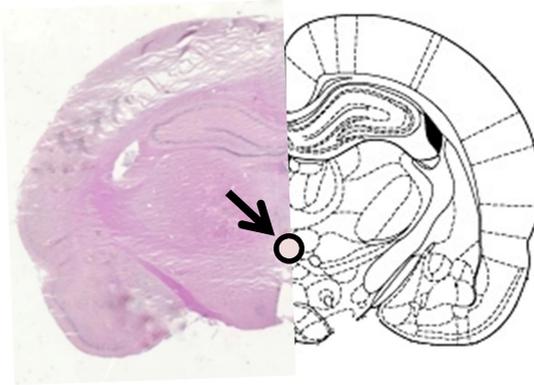
No momento da microinjeção o animal foi mantido imobilizado e a cânula foi desobstruída com uma lima odontológica de 15mm (Dentsply Ltda., Brasil). A agulha foi introduzida na cânula e a infusão foi realizada com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight, Brasil), no volume de 0,2 $\mu$ L durante 60 segundos. Após a injeção, a agulha foi mantida em posição por mais 60 segundos para assegurar a infusão total da droga e reduzir o fluxo retrógrado da solução.

#### 4.5. Histologia

Ao término dos experimentos, os animais receberam uma solução anestésica de quetamina (100 mg/ml/kg) e xilazina (10 mg/ml/kg) por via intraperitoneal. Após atingirem plano anestésico adequado, os animais receberam uma solução contendo cloral hidratado

(30% p/v; 3 ml/animal; Vetec, Brasil) através de injeção intraperitoneal, seguida pela microinjeção central de corante azul de Evans (0,2 µl). Após a decapitação, os encéfalos foram retirados e conservados individualmente em solução de formalina 10% por 48h, sendo posteriormente transferidos para uma solução de sacarose 30% por, no mínimo, 48 horas antes da realização dos cortes histológicos. Para a verificação do sítio de injeção da droga, cortes coronais de 10 µm de espessura foram obtidos utilizando um criostato (Leica CM 1850, Alemanha) a uma temperatura aproximada de -25 °C. Os cortes foram fixados em lâminas de vidro para microscopia, gelatinizadas. Após a secagem, as lâminas foram submetidas à coloração por Hematoxilina-Eosina, montadas com resina sintética e cobertas com lamínulas.

Imagens histológicas representativas foram obtidas com o auxílio de um microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, EUA) equipado com câmera digital. Os cortes foram comparados a diagramas do cérebro de ratos (PAXINOS; WATSON, 2009) e apenas os animais com histologia confirmada para o NR foram incluídos na análise estatística dos dados. A figura 6 é uma imagem representativa do NR com o sítio de infusão considerado como correto para a análise histológica.



**Figura 6. Imagem representativa do sítio de infusão considerado correto para a histologia do NR.**

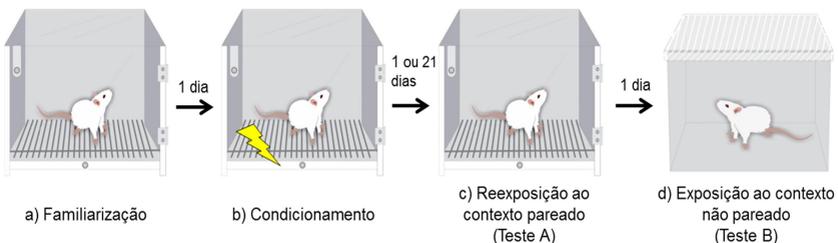
#### 4.6. Condicionamento de medo contextual

O condicionamento de medo contextual foi realizado em uma caixa retangular (35 x 20 x 30 cm), com paredes laterais e posterior de alumínio e parede frontal de acrílico, assim como sua tampa. O piso gradeado, feito com barras de aço inoxidável (3 mm de diâmetro, com 9 mm de espaçamento) encontrava-se conectado a um gerador digital de choques elétricos (Insight, Brasil). Esta caixa será doravante denominada de contexto pareado ou contexto A. Uma segunda caixa quadrada (30 x 30 x 30 cm) feita inteiramente de vidro transparente e com uma tampa gradeada foi utilizada como contexto não pareado ou contexto B. Esse contexto apresenta pistas diferentes daquelas apresentadas no contexto A.

Os experimentos comportamentais foram realizados sob condições de luminosidade controlada (70 lux) e ocorreram entre as 10:00 e as 16:00. Cada animal passou por uma sessão de familiarização, na qual foi permitido explorar o contexto A livremente por 3 minutos (exceto em um experimento, onde o animal passou pelas etapas de familiarização e condicionamento durante a mesma sessão. Essa informação estará indicada na descrição dos resultados). No dia seguinte, ocorreu a sessão de condicionamento ou pareamento, durante a qual o animal recebeu, após 30s de livre exploração, **3 choques** elétricos nas patas (0,8 mA, 60 Hz, por 3 segundos), com intervalo de 30 segundos entre cada choque. A intensidade dos choques elétricos foi definida com base em padronização utilizando animais que passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a injeção de drogas após o condicionamento. Foi considerada adequada a intensidade que provocava intenso aprendizado, sugerido por níveis de congelamento entre 70% e 85% na primeira reexposição ao contexto pareado, sem provocar a generalização da resposta de medo (níveis de congelamento de até 20% no contexto não pareado, utilizando 3 choques). Após a aplicação dos choques elétricos, o animal foi deixado por mais 30 segundos no contexto A e então retirado e devolvido à caixa-moradia. Este protocolo será denominado, neste trabalho, de **treino forte**. Nos experimentos em que os animais receberam um treino de menor intensidade, apenas **1 choque** (de mesma intensidade) foi aplicado após os 30 segundos iniciais de exploração, sendo o animal retirado do contexto 30 segundos depois. Este condicionamento de menor intensidade será posteriormente chamado de **treino fraco**, por gerar, em

geral, uma resposta comportamental menos intensa. Para todos os experimentos que visavam interferir na consolidação da memória de medo adquirida, os tratamentos foram feitos logo após o condicionamento.

Um dia após o condicionamento, os animais foram reexpostos ao contexto pareado (contexto A) durante 3 minutos, sem a apresentação de choques, para a evocação e avaliação comportamental da memória (Teste A). Um dia depois, os animais foram expostos ao contexto não pareado (contexto B) durante 3 minutos, a fim de avaliar a resposta comportamental frente a um novo contexto, em teoria, neutro. Quando o objetivo foi interferir com a reconsolidação da memória de medo, uma sessão adicional de evocação da memória no contexto pareado, também de 3 minutos, foi realizada no dia após o condicionamento, sem a apresentação de choques. De maneira geral, todas as sessões foram espaçadas entre si por um período de 24 h. Para avaliar uma memória remota, no entanto, os testes A e B foram realizados 21 dias após o condicionamento. Todas as variações de protocolo são descritas conforme necessário durante a descrição dos resultados.



**Figura 7. Protocolo básico de condicionamento de medo contextual utilizado neste trabalho.** a) 24h antes das sessões de condicionamento, os animais foram

familiarizados ao contexto que seria pareado, sendo permitida sua exploração por 3 minutos. b) A sessão de condicionamento pode ser feita com 1 (treino fraco) ou 3 choques (treino forte). c) A reexposição ao contexto pareado visa observar a retenção da memória de medo de forma recente (1 dia depois) ou remota (21 dias depois), e a d) a exposição ao contexto não pareado 24h depois visa a observação do comportamento do animal quando exposto a um contexto não pareado. Modificações nesse protocolo foram realizadas quando necessário para atingir o objetivo do experimento em questão e são apontadas no decorrer da descrição de resultados.

Para as sessões de extinção, os animais foram reexpostos ao contexto pareado por um período de 15 minutos, que posteriormente foi analisado em 5 blocos de 3 minutos cada. Durante os 15 minutos da sessão, o tempo de congelamento dos animais foi quantificado, em segundos.

O comportamento de congelamento (*freezing*) é comumente utilizado como um índice de medo em roedores, uma vez que é um comportamento inato, e pode ser definido como a ausência total de movimentos, exceto aqueles necessários para a respiração do animal (FANSELOW, 1980). Assim, o tempo de congelamento dos animais foi quantificado, em segundos, a cada minuto das sessões de evocação e testes e expresso em porcentagem do tempo total de cada sessão.

Todos os experimentos comportamentais foram gravados por uma câmera de vídeo acoplada a um aparelho de DVD, permitindo a posterior avaliação dos comportamentos. O experimentador permanecia na antessala, acompanhando o comportamento do animal através do monitor. A limpeza dos contextos, após o uso com cada animal, foi realizada com solução de etanol a 10% (v/v).

#### 4.7. Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) era construído em MDF cinzento (EP-151, Insight, Brasil), com uma plataforma central e quatro braços, sendo dois deles abertos circundados por anteparos de acrílico com 1 cm de altura (50 x 10 cm) e dois deles fechados por paredes laterais também de MDF cinzento (50 x 10 x 40 cm), dispostos de maneira oposta. Os testes foram realizados sob iluminação de 40 lux.

A sessão no LCE durou 5 minutos, sendo os animais colocados no aparato na plataforma central, voltados para um dos braços fechados. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera de vídeo acoplada a um aparelho de DVD. O experimentador permanecia na antessala e acompanhava o comportamento do animal pelo monitor. A limpeza do aparato foi feita com uma solução de etanol a 10% (v/v) após o teste com cada animal.

Os parâmetros analisados e posteriormente descritos nos resultados foram: número de entradas nos braços fechados (EBF), porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA; [(entradas nos braços abertos/total de entradas nos braços abertos e fechados) x 100], porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA; [(tempo nos braços abertos/300)x100]) e frequência de posturas de avaliação de risco (PAR). As posturas de avaliação de risco são definidas pelo comportamento de estiramento, quando o animal coloca ao menos uma pata em um dos braços abertos e, em seguida, volta à posição original no centro do aparato ou no braço fechado. As entradas nos braços fechados e abertos só foram consideradas quando os animais colocavam as quatro patas no braço em questão. Já o tempo de permanência era quantificado

a partir da entrada do roedor (com as quatro patas) em um braço até que o mesmo colocasse uma pata em outra parte do aparato.

## 4.8. Imunohistoquímica

### 4.8.1. Perfusão intracardiaca e preparação do tecido cerebral

Noventa minutos após a sessão de condicionamento de medo contextual e a infusão de muscimol 4 nmol/ 0,2 µL ou veículo (também no volume de 0,2 µL), os animais receberam uma solução anestésica contendo cloral hidratado 15% (p/v) (2,3 mg/ml/kg; Vetec, Brasil) e xilazina (10 mg/ml/kg; Syntec, Brasil) por via sistêmica através de injeção intraperitoneal, seguida de perfusão intracardiaca. Inicialmente foi estabelecido um fluxo com solução salina heparinizada (0,9% NaCl / 0,05% heparina; aproximadamente 300 mL por animal) e posteriormente com uma solução de paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M (pH 7,4; aproximadamente 200 mL por animal). Após decapitação, os encéfalos foram retirados e conservados em solução de paraformaldeído 4 % em PBS por 24 h. Posteriormente, foram transferidos para uma solução de álcool 50 % (v/v), onde permaneceram por até 48 h e, depois, para uma solução de álcool 70 % (v/v) onde permaneceram até seu processamento (Processador de amostras Leica TP1020). Após o emblocamento em parafina (Emblocador de amostras Leica EG1150H), cortes seriados das regiões de interesse (5 µm) foram obtidos em um micrótomo (Micrótomo rotativo Leica RM2255) e fixados em lâminas

de vidro para microscopia, gelatinizadas. Adicionalmente, foram coletados encéfalos de ratos naïve e ratos submetidos à cirurgia estereotáxica para o NR, porém não submetidos ao condicionamento de medo contextual nem à infusão de drogas, servindo como controles deste experimento. Também foram coletados encéfalos de animais que receberam a infusão de muscimol ou veículo nas concentrações acima citadas e que não passaram pelo condicionamento de medo contextual, sempre aguardando um período de 90 minutos entre a injeção da droga e a perfusão.

#### 4.8.2. Reação imunoistoquímica para Arc

A parafina foi derretida em estufa a 100°C por 2 minutos e as lâminas foram então imediatamente imersas em 3 banhos de xilol (5 min cada), seguidos por 3 banhos de álcool etílico absoluto (5 min cada), e em seguida mergulhadas em dois banhos de água destilada. A peroxidase endógena foi bloqueada com uma solução de peróxido de hidrogênio 3 % (v/v) em metanol absoluto por 20 minutos, em temperatura ambiente, no escuro. Após 2 lavagens (5 min) com TBS 0,01M (pH 7,0) gelado, a reativação antigênica foi feita com uma solução de tripsina diluída em TBS 1:1 (v/v) pipetada nos cortes e incubação em estufa a 37°C por 5 minutos. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com BSA 1% em TBS durante 60 minutos, em temperatura ambiente. As lâminas foram então incubadas com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-Arc (1:250 em solução de bloqueio; Santa Cruz Biotechnology, EUA) em câmara úmida a 4°C

*overnight* (14-16 h). Após a incubação, as lâminas foram lavadas com TBS gelado (3 x 5 min) e incubadas com anticorpo secundário biotilado IgG de cabra anti-coelho (1:500; Santa Cruz Biotechnology, EUA) por 120 minutos em câmara úmida, temperatura ambiente. Após mais lavagens em TBS gelado (3 x 5 min), os cortes foram incubados com o complexo ABC avidina-biotina-peroxidase (1:500 em TBS-T; Vector Laboratories, EUA) por 60 minutos em câmara úmida, temperatura ambiente. A revelação foi feita com uma solução contendo tetracloro de 3'3'-diaminobenzidina (DAB 0,02%, Sigma Aldrich, EUA), peróxido de hidrogênio, DMSO e TBS durante 120 segundos. A contra-coloração foi feita com banho de hematoxilina por 30 segundos seguido de lavagem em água corrente por 3 minutos e banho rápido de água amoniacal 0,05%. As lâminas foram então desidratadas em banhos consecutivos de álcool absoluto e xilol, e montadas com Bálsamo do Canadá e lamínulas de vidro.

#### 4.8.3. Regiões de interesse e quantificação de células Arc<sup>+</sup>

Secções contendo (1) o córtex pré-límbico, (2) CA1 do hipocampo ventral e (3) CA1 do hipocampo dorsal e a amígdala basolateral foram visualizadas e imagens dessas regiões foram obtidas através de uma câmera digital acoplada a um microscópio Leica DM5500 B, em aumento de 20x. Três imagens de cada região de cada encéfalo foram capturadas. A coloração castanha ou roxa dentro da célula é indicativa de marcação positiva. As células Arc<sup>+</sup> foram quantificadas manualmente utilizando o programa ImageJ (NIH, EUA).

A média foi considerada como número total de células em  $0,03 \text{ mm}^2$  para aquela região de cada encéfalo.

#### 4.9. Análise estatística

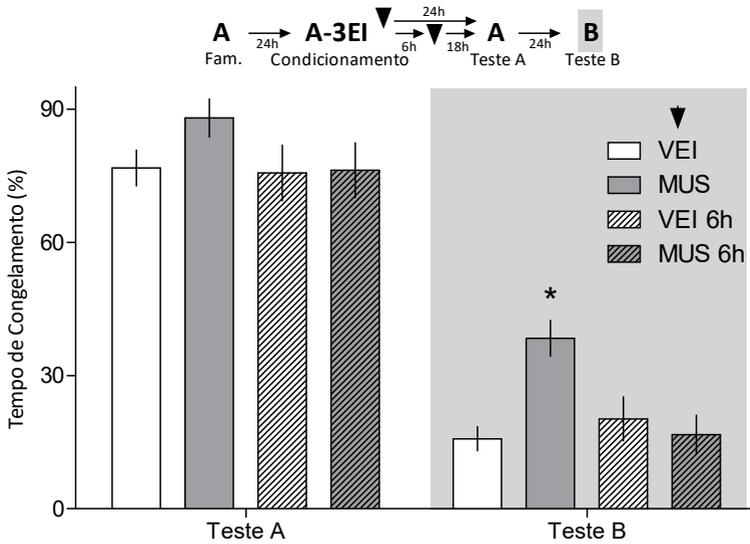
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Após ter sido assegurada a distribuição normal dos dados e a homogeneidade de variância, estes foram submetidos ao teste “t” de Student para grupos independentes ou à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, conforme necessário. Quando reexposições ao mesmo contexto foram analisadas, adotamos a ANOVA de medidas repetidas. Após as análises de variância, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls foi aplicado, adotando-se um valor de significância estatística  $P < 0,05$ . Todos os dados obtidos foram analisados com o software Statistica® 13.1 (Dell, StatSoft Inc., EUA) e representados graficamente através do GraphPad Prism® 5 (GraphPad Prism, EUA)

## 5. RESULTADOS

5.1. Efeitos da inativação temporária do núcleo reuniens do tálamo (NR) após o condicionamento nos níveis de congelamento expresso nos contextos pareado e não pareado em memórias aversivas

Em um primeiro experimento para investigar a participação do NR na consolidação de memórias aversivas, 35 animais foram alocados aleatoriamente em 4 grupos ( $n= 7-10$  por grupo) baseando-se na injeção central direcionada ao NR recebida (veículo ou muscimol 4 nmol) e no momento em que a injeção foi realizada (logo após a sessão de condicionamento ou 6h após a sessão). Todos os animais passaram pelo protocolo de condicionamento com 3 choques de 0,8 mA (treino forte).

Uma ANOVA de duas vias indicou uma interação significativa entre o tratamento e o momento de injeção ( $F_{2,30}= 5,07$ ;  $P= 0,012$ ) durante o teste B. Os animais que tiveram o NR inativado imediatamente após o condicionamento, mas não 6h depois, apresentaram um aumento do tempo de congelamento quando expostos ao contexto não pareado (Teste B), o que pode ser interpretado como expressão generalizada do medo. Todos os grupos apresentaram níveis comparáveis de congelamento no contexto pareado (Teste A) (momento de injeção:  $F_{1,31}= 1,52$ ;  $P= 0,226$ ; tratamento:  $F_{1,31}= 1,299$ ;  $P= 0,263$ ; interação entre os fatores:  $F_{1,31}= 1,05$ ;  $P= 0,313$  – Figura 8).

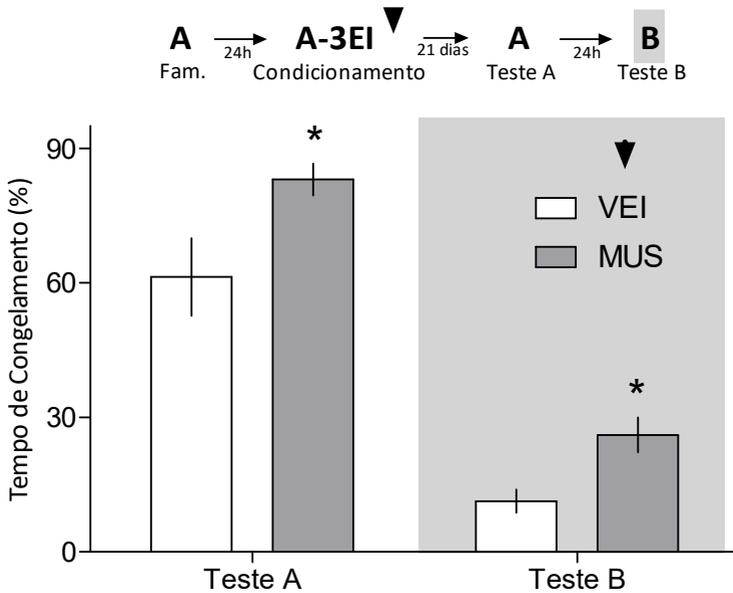


**Figura 8: A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo imediatamente, mas não 6h, após a aquisição de uma memória aversiva aumenta a expressão de congelamento em um contexto não pareado.** Veículo (VEI) ou muscimol (MUS; 4 nmol) foram injetados no NR logo após a sessão de condicionamento contextual (0h) ou 6h após a sessão. As setas indicam os momentos de injeção. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou não pareado (Teste B) (VEI 0h n=9; MUS 0h n=10; VEI 6h n=7; MUS 6h n=9). \* indica uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação aos demais grupos (ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

Em um segundo experimento, visando confirmar a participação do NR na consolidação de memórias aversivas em longo prazo e descartar um possível efeito de sensibilização, 16 animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos (n = 8 por grupo) baseando-se na injeção central direcionada ao NR recebida (veículo ou muscimol 4 nmol). Todos os animais passaram pelo protocolo de condicionamento

com 3 choques de 0,8 mA (treino forte). Estes animais foram então testados no contexto pareado (Teste A) 21 dias após o condicionamento e no contexto não-pareado (Teste B) 24h após o teste A.

Conforme demonstra graficamente a figura 9, existem diferenças significativas na porcentagem de congelamento dos animais tanto no teste A ( $t_{14}= 2,32$ ;  $P= 0,035$ ) quanto no teste B ( $t_{14}= 2,75$ ;  $P= 0,015$ ), mostrando uma influência do tratamento. Estas diferenças indicam um efeito duradouro da intervenção no NR durante a consolidação da memória aversiva sobre o congelamento no contexto não pareado (teste B), assim como uma maior persistência da memória aversiva nos animais que tiveram o NR inativado, demonstrada por um maior congelamento no contexto pareado (teste A) 21 dias após o condicionamento em comparação com os animais que receberam veículo.



**Figura 9:** A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo logo após a aquisição de uma memória aversiva aumenta a expressão de congelamento em um contexto não pareado 21 dias após o condicionamento, assim como a persistência da expressão de medo no contexto pareado. Veículo (VEI) ou muscimol (MUS; 4 nmol) foram injetados no NR logo após a sessão de condicionamento contextual. A seta indica o momento de injeção. Valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (teste A) 21 dias após o condicionamento ou frente ao contexto não pareado (teste B) 22 dias após o condicionamento (VEI n=8; MUS n=8). \* indica uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (Teste “t” de Student para grupos independentes).

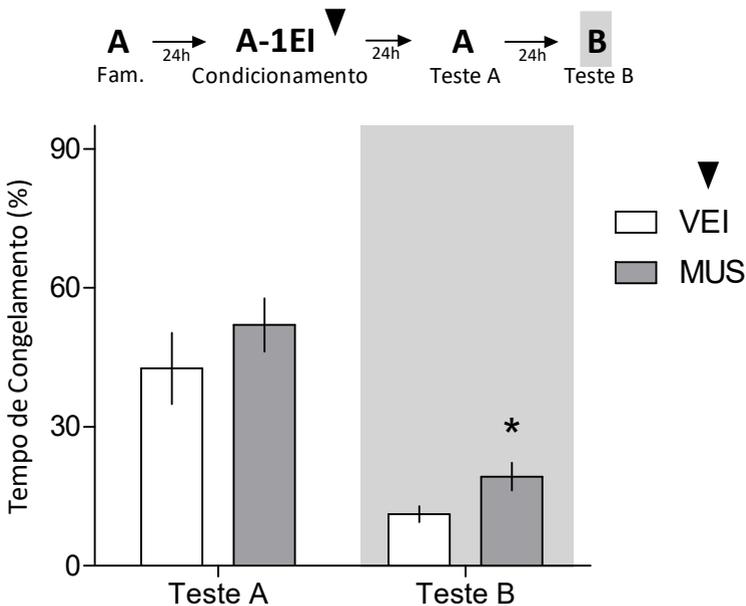
## 5.2. Efeitos da inativação temporária do núcleo reuniens do tálamo (NR) após o condicionamento nos níveis de congelamento expresso nos contextos pareado e não pareado em memórias aversivas adquiridas após um estímulo de menor intensidade

Para confirmar os efeitos vistos nos experimentos anteriores sem a existência de um efeito teto no contexto pareado (teste A) que poderia esconder uma possível potencialização da memória de medo e investigar uma possível influência da intensidade do estímulo, dois experimentos foram conduzidos utilizando um treino de menor intensidade (1 choque de 0,8mA): um deles buscou investigar os efeitos da inativação do NR sobre uma memória de medo recente de menor intensidade, enquanto o outro investigou os efeitos da mesma inativação a longo prazo (21 dias após o condicionamento) induzida também por um treino de menor intensidade.

Em um primeiro experimento, 20 animais foram alocados aleatoriamente em 2 grupos distintos (n=10 por grupo), baseados na injeção central direcionada ao NR recebida (veículo ou muscimol 4 nmol). Todos os animais receberam o treino de menor intensidade, foram testados no contexto pareado (teste A) 24 h após o condicionamento e no contexto não pareado (teste B) 48h após.

Como demonstra a figura 10, não foi observada uma diferença significativa nos níveis de congelamento no contexto pareado (teste A), indicando que não houve uma potencialização da memória de medo

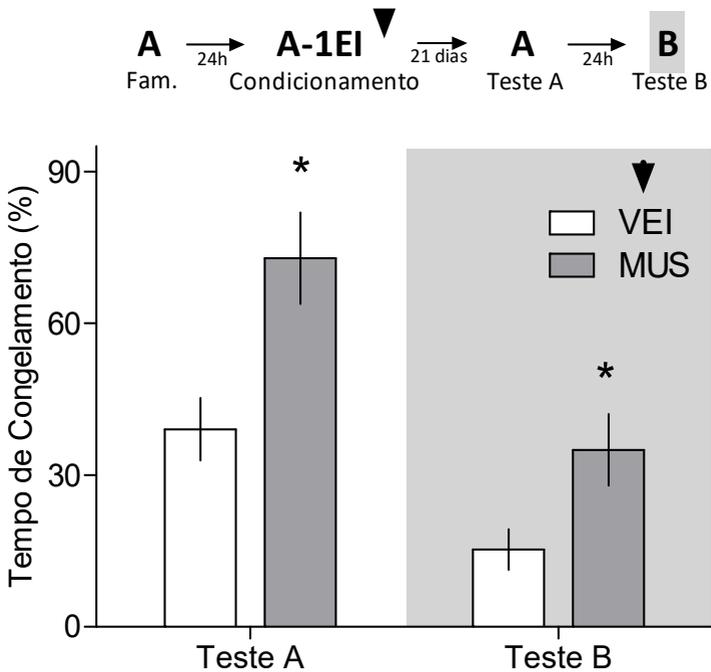
( $t_{18} = -0,895$ ;  $P = 0,382$ ). No entanto, o teste “t” de Student indica um efeito significativo do tratamento no congelamento observado no contexto não pareado (teste B) ( $t_{18} = -2,104$ ;  $P = 0,049$ ). Estes resultados demonstram que não houve uma potencialização da memória de medo após a inativação do NR durante a consolidação, mas o aumento do congelamento no contexto não pareado permaneceu, mesmo com a diminuição da intensidade do treino.



**Figura 10: Em uma memória aversiva recente induzida por um treino de menor intensidade, a inativação do NR aumenta a expressão de congelamento em um contexto não pareado, mas não no contexto pareado.** Veículo (VEI) ou muscimol (MUS; 4 nmol) foram injetados no NR logo após a sessão de condicionamento de medo contextual com um treino de menor intensidade (1 choque de 0,8 mA). A seta indica o momento de injeção. Valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (teste A) 24h após o condicionamento e frente ao contexto não pareado 48h após (VEI  $n=10$ ; MUS  $n=10$ ). \* indica uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (Teste “t” de Student para grupos independentes).

Num segundo experimento, 12 animais foram alocados aleatoriamente em dois grupos ( $n= 6$  por grupo), também se baseando na injeção central direcionada ao NR recebida (veículo ou muscimol 4 nmol). Todos os animais receberam o treino de menor intensidade e foram testados no contexto pareado (teste A) 21 dias após o condicionamento. O teste no contexto não pareado (teste B) ocorreu 24h após o teste A.

O teste “t” de Student indicou um efeito significativo do tratamento tanto no congelamento observado no contexto pareado (teste A) ( $t_{10}= 3,076$ ;  $P= 0,011$ ) quanto no congelamento observado no contexto não pareado (teste B) ( $t_{10}= 2,243$ ;  $P= 0,035$ ) (Figura 11). Por se tratar da expressão em longo prazo, estes resultados indicam não uma potencialização da memória de medo, mas sim um aumento de sua persistência. O aumento do congelamento no contexto não pareado indica um efeito duradouro da inativação temporária do NR sobre a especificidade da memória de medo, independente da intensidade do treino utilizado.



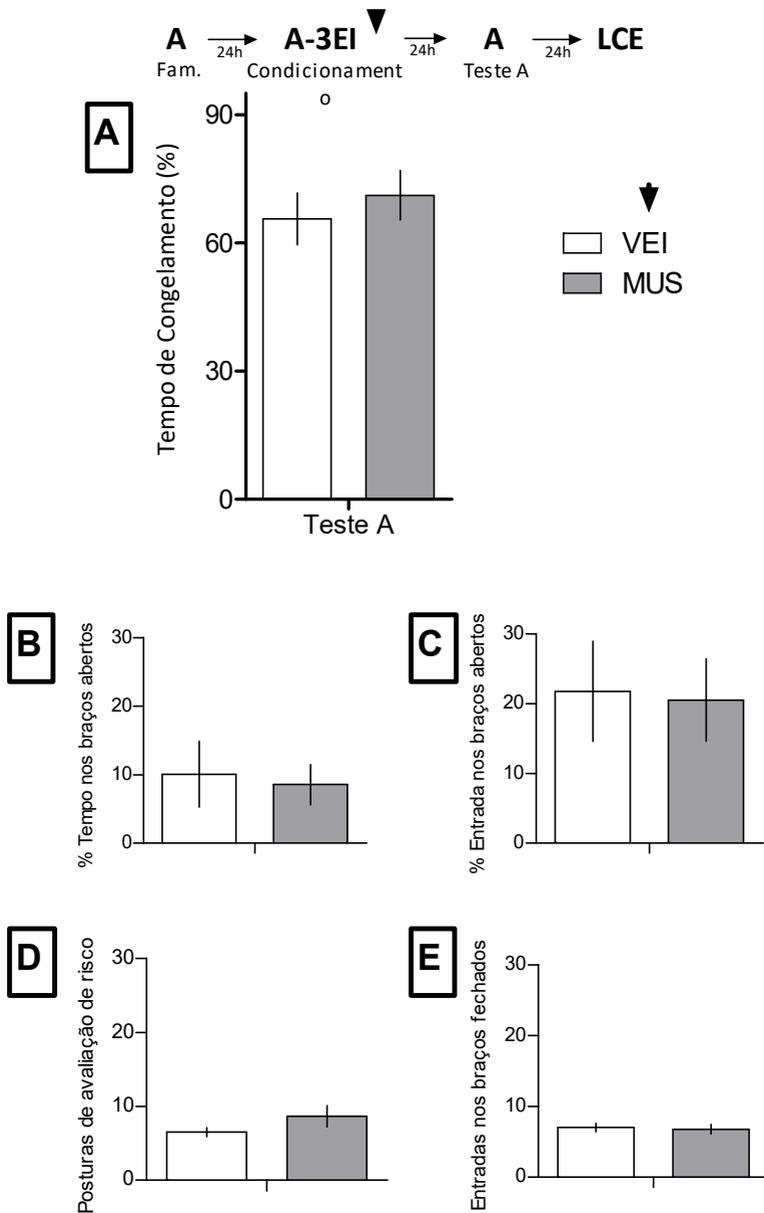
**Figura 11:** Em uma memória remota induzida por um treino de menor intensidade, a inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo provoca um aumento da persistência e aumento da expressão de congelamento em um contexto não pareado. Veículo (VEI) ou muscimol (MUS; 4 nmol) foram injetados no NR logo após a sessão de condicionamento contextual com um treino de menor intensidade (1 choque de 0,8 mA). A seta indica o momento de injeção. Valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (teste A) 21 dias após o condicionamento e frente ao contexto não pareado 22 dias após (VEI n=6; MUS n=6). \* indica uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (Teste “t” de Student para grupos independentes).

### 5.3. Efeitos da inativação temporária do núcleo reuniens do tálamo (NR) após o condicionamento sobre o comportamento tipo ansioso e a atividade exploratória geral no labirinto em cruz elevado

Objetivando investigar se o aumento do congelamento observado no contexto não pareado nos experimentos anteriormente descritos se deve a 1) sensibilização causada pelo condicionamento contextual, 2) reduzida atividade exploratória provocada pela inativação do NR ou 3) aumento de comportamentos tipo-ansiosos e defensivos, 17 animais foram separados em dois grupos ( $n= 8$  ou  $9$  por grupo) baseados na injeção central direcionada ao NR recebida (veículo ou muscimol  $4$  nmol). Os animais passaram pelas etapas de familiarização e condicionamento de medo contextual utilizando um treino forte, foram submetidos ao teste no contexto pareado (teste A) e, no momento em que seriam testados no contexto não pareado (teste B), foram alternativamente submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado como descrito em Materiais e Métodos. Os animais receberam a injeção central direcionada ao NR logo após a sessão de condicionamento contextual, como nos experimentos anteriores.

Não foram observadas quaisquer diferenças significativas entre os grupos muscimol e controle em nenhum dos parâmetros analisados utilizando o teste “t” de Student (Fig 12): %TBA ( $t_{15}= 0,276$ ;  $P= 0,785$  – Figura 12B), %EBA ( $t_{15}= 0,892$ ;  $P= 0,892$  – Figura 12C) e PAR ( $t_{15}= -1,114$ ;  $P= 0,282$  – Figura 12D), indicando que não houve um aumento

do comportamento tipo-ansioso; e EBF ( $t_{15} = 0,396$ ;  $P = 0,697$  – Figura 12E), indicando atividade exploratória geral normal, sem prejuízos locomotores. Não houve também, como nos experimentos anteriores, qualquer diferença significativa na porcentagem de congelamento dos animais quando expostos ao contexto pareado (teste A) ( $t_{15} = -0,659$ ;  $P = 0,519$ ; Fig 12A).



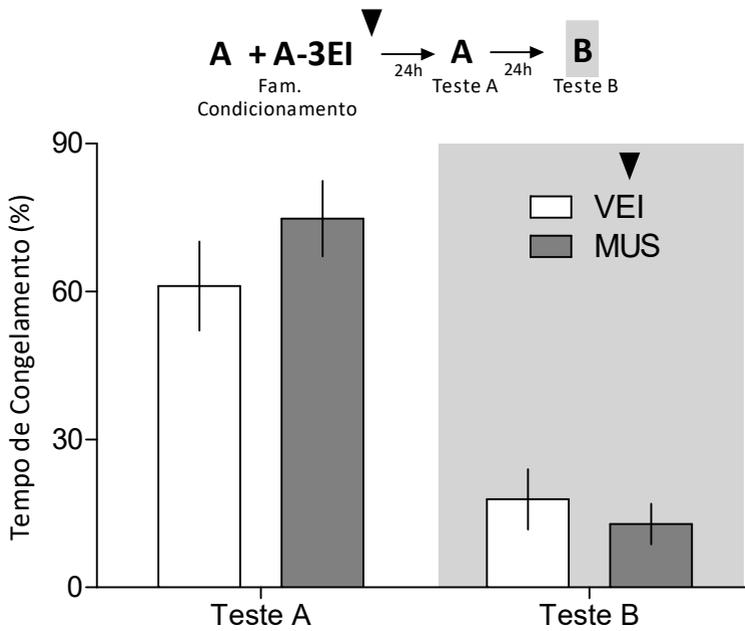
**Figura 12: A inativação do NR após a aquisição da memória aversiva não afeta o comportamento tipo-ansioso e a atividade exploratória no labirinto em cruz elevado.** Veículo (VEI) ou muscimol (MUS; 4 nmol) foram injetados no NR logo após o condicionamento contextual. A seta indica o momento de injeção. Valores são expressos como média  $\pm$  EPM da (A) porcentagem de tempo de congelamento no contexto pareado (teste A), (B) porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA), (C) porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA), (D) número total de posturas de avaliação de risco (PAR) e (E) número total de entradas nos braços fechados (EBF). VEI n=8; MUS n= 9. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados (teste “t” de Student para grupos independentes).

#### 5.4. Efeitos da inativação temporária do núcleo reuniens do tálamo (NR) após uma sessão de condicionamento precedida imediatamente pela familiarização ao contexto

Na busca de subsidiar a hipótese de que o NR é importante para a consolidação de memórias aversivas devido ao seu papel de mediação entre o HPC e o CPFm, 15 animais foram aleatoriamente alocados em dois grupos (n= 7 ou 8 por grupo), baseados na injeção central direcionada ao NR (veículo ou muscimol 4 nmol) após uma sessão que consistiu na familiarização ao contexto pela exposição inicial dos animais ao contexto A durante três minutos seguida pelo condicionamento nos dois minutos subsequentes, começando aos 3 minutos e 30 segundos de exposição, com três choques de 0,8 mA com intervalos de 30s entre cada estímulo. Dessa forma, não há tempo hábil para a formação de um engrama consolidado contendo as informações espaciais do contexto de forma prévia, como no protocolo utilizado nos experimentos anteriores (familiarização ao contexto 24h antes do condicionamento). Assim, supomos que as informações contextuais não estão ainda presentes e consolidadas no CPFm e no HPC (VAN

KESTEREN et al., 2012). Sendo o NR sugerido como importante em tarefas que recrutam tanto o HPC e o CPFm, pressupomos que sua inativação logo após o condicionamento imediatamente precedido pela familiarização não teria efeito sobre a memória aversiva.

Não foi observada uma diferença significativa nos níveis de congelamento no contexto pareado (teste A,  $t_{13} = 1,163$ ;  $P = 0,265$ ), indicando que a inativação do NR nessas condições não alterou a formação e consolidação da memória de medo. Também não foram encontradas diferenças no contexto não pareado (teste B,  $t_{13} = 0,693$ ;  $P = 0,500$ ) (Figura 13). Estes resultados sugerem que a atividade do NR durante a consolidação da memória de medo só se torna importante uma vez que haja um aprendizado associativo com interação entre engramas provenientes do CPFm e HPC.



**Figura 13: Quando inativado após o condicionamento aversivo precedido imediatamente pela etapa de familiarização, o NR parece não influenciar a consolidação da memória aversiva.** Veículo (VEI) ou muscimol (MUS; 4 nmol) foram injetados no NR logo após a sessão de condicionamento de medo contextual precedida pela familiarização ao contexto. A seta indica o momento de injeção. Valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (teste A) 24h após o condicionamento e frente ao contexto não pareado 48h após. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nem na reexposição ao contexto pareado nem na apresentação ao contexto não pareado (VEI n=7; MUS n=8) (Teste “t” de Student para grupos independentes).

### 5.5. Efeitos da inativação temporária do núcleo reuniens do tálamo (NR) após o condicionamento sobre a posterior extinção da memória aversiva

Com o objetivo de investigar se a memória consolidada após a inativação do NR apresenta outras características semelhantes às

observadas em pacientes psiquiátricos e em modelos animais de TEPT, como uma menor susceptibilidade à extinção, 17 animais foram alocados em dois grupos ( $n= 8$  ou  $9$  por grupo), baseados na injeção central direcionada ao NR recebida (veículo ou muscimol  $4 \text{ nmol} / 0.2 \mu\text{L}$ ). O perfil comportamental dos animais foi confirmado com a realização de testes nos contextos pareado e não pareado ( $A_1$  e  $B_1$ , respectivamente), seguidos por uma sessão de extinção (como previamente descrita em Materiais e Métodos) no dia seguinte. A retenção da memória de extinção/supressão da memória original e os efeitos da extinção sobre o congelamento no contexto não pareado foram avaliados em uma segunda exposição dos animais ao contexto pareado 24h após a extinção (teste  $A_2$ ) e ao contexto não pareado 48h após a extinção (teste  $B_2$ ).

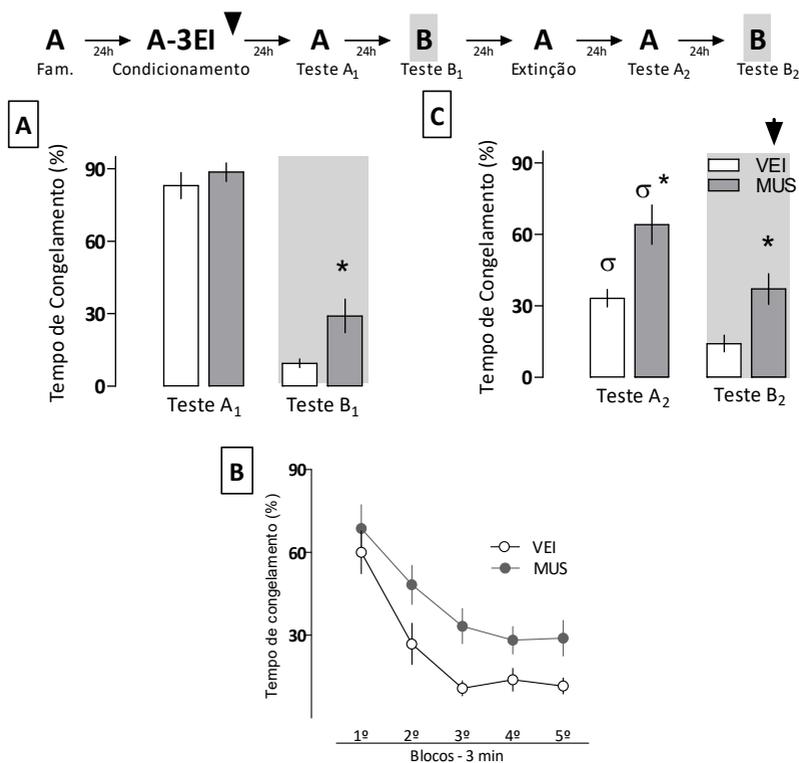
Como observado em experimentos descritos anteriormente, a inativação farmacológica do NR após a aquisição da memória de medo induziu um aumento no congelamento no contexto não pareado (teste B) ( $t_{15}= 2,617$ ;  $P= 0,019$ ), enquanto que não foi observada uma diferença significativa no contexto pareado (teste A) ( $t_{15}= 0,861$ ;  $P= 0,402$ ; Fig. 14A). Durante a sessão de extinção, uma ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito significativo para os fatores tratamento ( $F_{1,15}= 16,645$ ;  $P= 0,0009$ ) e blocos de extinção ( $F_{4,60}= 18,503$ ;  $P= 0,0000$ ), porém não houve uma interação entre os fatores ( $F_{4,60}= 0,415$ ;  $P= 0,796$ ) (Figura 14B). Nos testes  $A_2$  e  $B_2$ , o grupo que teve o NR inativado durante a consolidação da memória de medo apresentou porcentagens de congelamento significativamente maiores do que o grupo controle nos mesmos testes ( $A_2$ :  $t_{15}= 3,270$ ;  $P= 0,005$ ;  $B_2$ :  $t_{15}= 3,007$ ;  $P= 0,008$ ; Fig.

14C), o que demonstra tanto uma extinção deficitária da memória de medo quanto a ausência de interferência da extinção sobre o congelamento no contexto não pareado.

Quando comparamos os testes  $A_1$  e  $A_2$  utilizando uma ANOVA de medidas repetidas, foi observado um efeito significativo para o tratamento ( $F_{1,15} = 6,742$ ;  $P = 0,020$ ), para o dia do teste (antes ou após a sessão de extinção) ( $F_{1,15} = 84,241$ ;  $P = 0,0000$ ) e uma interação significativa entre estes dois fatores ( $F_{1,15} = 9,817$ ;  $P = 0,006$ ). O *post-hoc* de Newman-Keuls indica que ambos os grupos são diferentes de si mesmos no teste  $A_1$ , mas somente no teste  $A_2$  há uma diferença significativa entre os grupos. Já quando comparamos os testes  $B_1$  e  $B_2$ , há um efeito significativo apenas para o tratamento ( $F_{1,15} = 11,112$ ;  $P = 0,004$ ). O *post-hoc* de Newman-Keuls indica que ambos os grupos não são diferentes de si mesmos quando comparado entre os testes  $B_1$  e  $B_2$ , indicando que a extinção não teve um efeito nos níveis de congelamento no contexto não pareado, independentemente do tratamento utilizado, muito embora o grupo muscimol continue apresentando porcentagens significativamente maiores de tempo de congelamento no contexto não pareado quando comparado ao controle em  $B_2$  (Fig. 14C).

Somados, estes resultados indicam o grupo muscimol não retém a memória de extinção tão bem quanto o grupo controle, sendo esta, portanto, incapaz de suprimir as respostas de medo associadas à memória original da mesma forma que acontece no grupo controle. Além disso, não há diferença nos níveis de congelamento no contexto não pareado entre os testes  $B_1$  e  $B_2$ , indicando que o processo de extinção não teve qualquer efeito sobre a expressão generalizada de medo causada pela inativação do NR durante a consolidação da

memória aversiva. Assim, podemos concluir que a memória consolidada durante a inativação do NR apresenta uma menor susceptibilidade ao processo de extinção, que pode resultar tanto de uma menor capacidade de labilização dessa memória quanto de uma maior persistência da mesma, como observado nos experimentos utilizando memórias remotas (ou, mais provavelmente, de uma combinação desses fatores)



**Figura 14: A memória consolidada após a inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo apresenta um déficit de extinção.** Veículo ou muscimol (MUS; 4 nmol) foram injetados no NR logo após a sessão de condicionamento contextual. A seta indica o momento da injeção. **(A)** Os animais foram testados tanto no contexto

pareado (teste A<sub>1</sub>) quanto no contexto não pareado (teste B<sub>1</sub>) nos dias subsequentes. **(B)** 24h depois, os animais foram submetidos a uma sessão de extinção (15 minutos) no contexto pareado seguida de **(C)** novos testes nos contextos pareado (teste A<sub>2</sub>) e não pareado (teste B<sub>2</sub>) nos dias subsequentes. Valores são expressos como média ± EPM da porcentagem de congelamento (VEI n=8; MUS n=9). \* indica uma diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ), # indica uma diferença significativa em relação ao próprio grupo durante o primeiro bloco da extinção e σ indica uma diferença significativa em relação ao mesmo grupo durante o teste A<sub>1</sub> (ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Newman-Keuls ou teste “t” de Student para grupos independentes).

## 5.6. Efeitos da inativação temporária do núcleo reuniens do tálamo (NR) após o condicionamento sobre a posterior labilização e possibilidade de interferência durante a reconsolidação da memória aversiva

Com o intuito de investigar a susceptibilidade à labilização da memória consolidada após a inativação do NR, 27 animais foram alocados em 4 grupos (n= 6-8 por grupo) baseados na injeção central direcionada ao NR recebida após o condicionamento (veículo ou muscimol 4 nmol / 0.2 µL), na injeção intraperitoneal recebida após a reativação (veículo ou clonidina 0,3 mg/kg). Estes animais foram submetidos ao condicionamento utilizando o treino forte, passaram por uma reativação de 3 minutos no contexto pareado (exceto o grupo não reativado), com o intuito de reativar e labilizar a memória, e foram posteriormente testados nos contextos pareado (teste A) e não pareado (teste B).

A ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito do pré-tratamento (injeção central de muscimol) ( $F_{1,23} = 8,819$ ;  $P = 0,006$ ), do momento (reativação ou teste A após reativação) ( $F_{1,23} = 7,392$ ;  $P =$

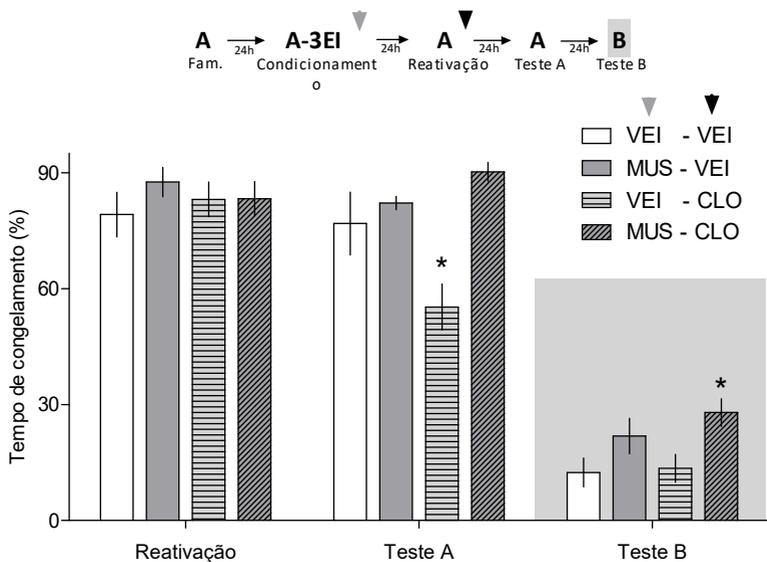
0,012), uma interação entre o pré-tratamento e o momento ( $F_{1,23}= 8,998$ ,  $P= 0,006$ ) e uma interação entre o pré-tratamento, a injeção intraperitoneal de clonidina após a reativação e o momento ( $F_{1,23}= 12,934$ ,  $P= 0,001$ ). Não houve diferença significativa entre as porcentagens de congelamento dos grupos durante a sessão de reativação. No entanto, quando reexpostos ao contexto pareado no teste A, os animais do grupo VEI-CLO apresentaram níveis significativamente menores de congelamento quando comparados a todos os outros grupos (*post-hoc* de Newman-Keuls) (Fig. 15).

Uma ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da inativação do NR após a sessão de condicionamento ( $F_{1,23}= 9,479$ ;  $P= 0,005$ ) no congelamento observado no contexto não pareado (teste B). O *post-hoc* de Newman-Keuls indica uma diferença significativa entre o grupo MUS-CLO e os grupos VEI-VEI e VEI-CLO (Fig. 15).

Adicionalmente, 15 animais foram alocados em dois grupos, ambos recebendo clonidina intraperitoneal na dose de 0,3 mg/kg e um deles recendo a injeção central de muscimol 4 nmol. Ambos os grupos passaram pelo condicionamento com 3 choques, mas 24 horas depois receberam a injeção de clonidina sem antes passar pela reativação da memória no contexto pareado, sendo submetidos aos testes A e B nos dias subsequentes. O teste “t” de Student mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos MUS-CLO e VEI-CLO não reativados na reexposição ao contexto pareado ( $t_{13}= -0,6336$ ;  $P= 0,5373$ ), mas sim na exposição ao contexto não pareado, com os animais do grupo MUS-CLO apresentando níveis significativamente maiores de congelamento ( $t_{13}= 4,2799$ ;  $P= 0,0008$ ) (Fig. 16). Estes grupos servem

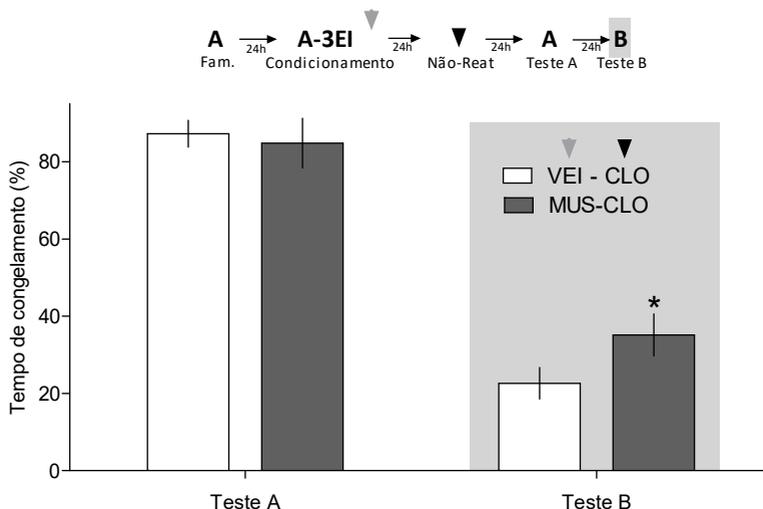
como controle e indicam a necessidade da reativação pela exposição ao contexto pareado para a ação da clonidina.

Estes resultados, em suma, indicam que a memória de medo consolidada após a inativação do NR apresenta um déficit de labilização, confirmado pela incapacidade da clonidina (uma droga que reconhecidamente interfere com a consolidação e a reconsolidação de memórias aversivas) de interferir com a memória de medo após a intervenção com o muscimol, tanto no contexto pareado quanto no contexto não pareado.



**Figura 15: A memória consolidada após a inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo é resistente ao efeito de um bloqueador de reconsolidação.** Veículo (VEI) ou muscimol (MUS – 4 nmol) foram injetados no NR logo após a sessão de condicionamento. Veículo (VEI) ou clonidina (CLO – 0,3 mg/kg i.p.) foram administrados após a sessão de reativação. As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média ± EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (reativação e teste A) e não pareado (teste B) (VEI-VEI n=6; MUS-VEI n=6; VEI-CLO n=7; MUS-CLO n=8). \* indica uma

diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação aos demais grupos experimentais (ANOVA de medidas repetidas ou de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).



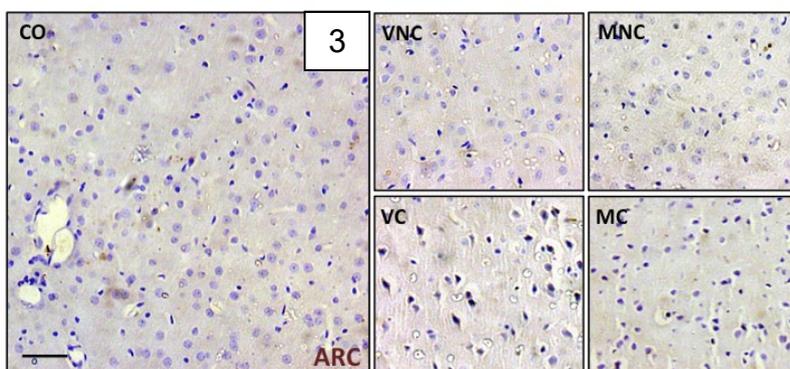
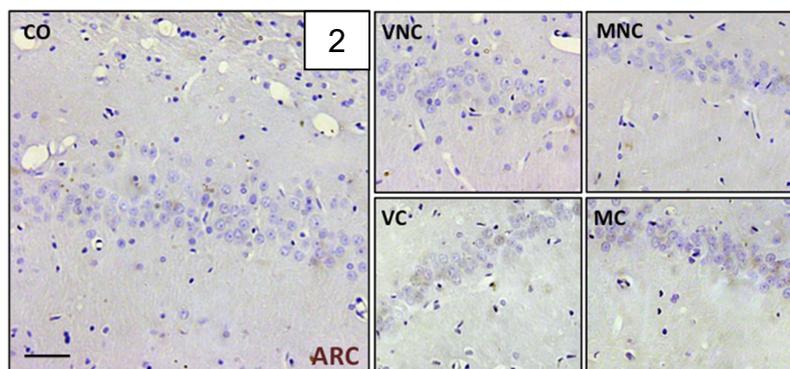
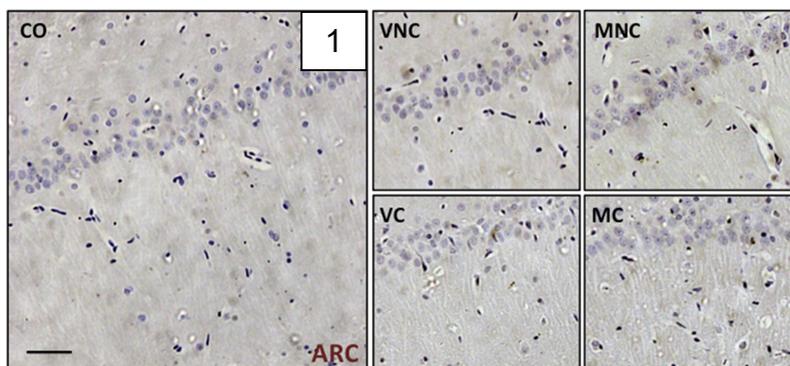
**Figura 16: Quando não reativada, a memória não é suscetível à interferência farmacológica.** Veículo (VEI) ou muscimol (MUS – 4 nmol) foram injetados no NR logo após a sessão de condicionamento. 24 horas depois, a clonidina (CLO – 0,3 mg/kg i.p.) foi administrada na sala de ambientação sem a exposição dos animais ao contexto pareado para reativação. As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (teste A) e não pareado (teste B). Vei-CLO n=8; MusC-CLO n=7; \* indica uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo Vei-CLO (teste “t” de Student para grupos independentes).

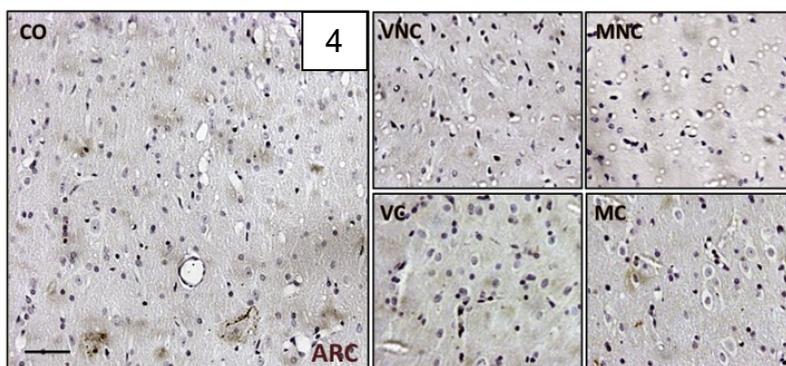
### 5.7. Efeitos da inativação temporária do núcleo reuniens do tálamo (NR) após o condicionamento sobre a expressão de Arc no córtex pré-límbico, amígdala basolateral e região CA1 das porções ventral e dorsal do HPC

Com o objetivo de investigar a plasticidade em regiões importantes para a consolidação do condicionamento de medo contextual e conectadas ao NR, 15 animais foram alocados em 5 grupos ( $n= 3$  por grupo) baseados na injeção central direcionada ao NR recebida (veículo ou muscimol 4 nmol) e no condicionamento contextual ou não. Um dos grupos, doravante denominado “controle operado”, refere-se a animais que passaram por anestesia pré-cirúrgica e cirurgia estereotáxica para o NR, porém foram mantidos em sua caixa-moradia até a perfusão intracardiaca, não tendo sido manipulados em experimentos comportamentais e não inclusos nas análises estatísticas. Assim, temos três grupos controle, sendo um deles o anteriormente citado, apenas submetido à cirurgia estereotáxica, e dois submetidos à injeção de muscimol ou veículo, mas não ao condicionamento, que foram eutanasiados 90 minutos após o recebimento da injeção. Os outros dois grupos foram submetidos à injeção de veículo ou muscimol após passarem pelo condicionamento de medo contextual, e também eutanasiados e perfundidos 90 minutos após a injeção.

A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do condicionamento em todas as regiões de interesse, com os animais condicionados apresentando significativamente mais células Arc<sup>+</sup> em relação aos controles (PL –  $F_{1,8}=23,113$ ,  $P=,00134$ ; BLA –  $F_{1,8}=5,1809$ ,

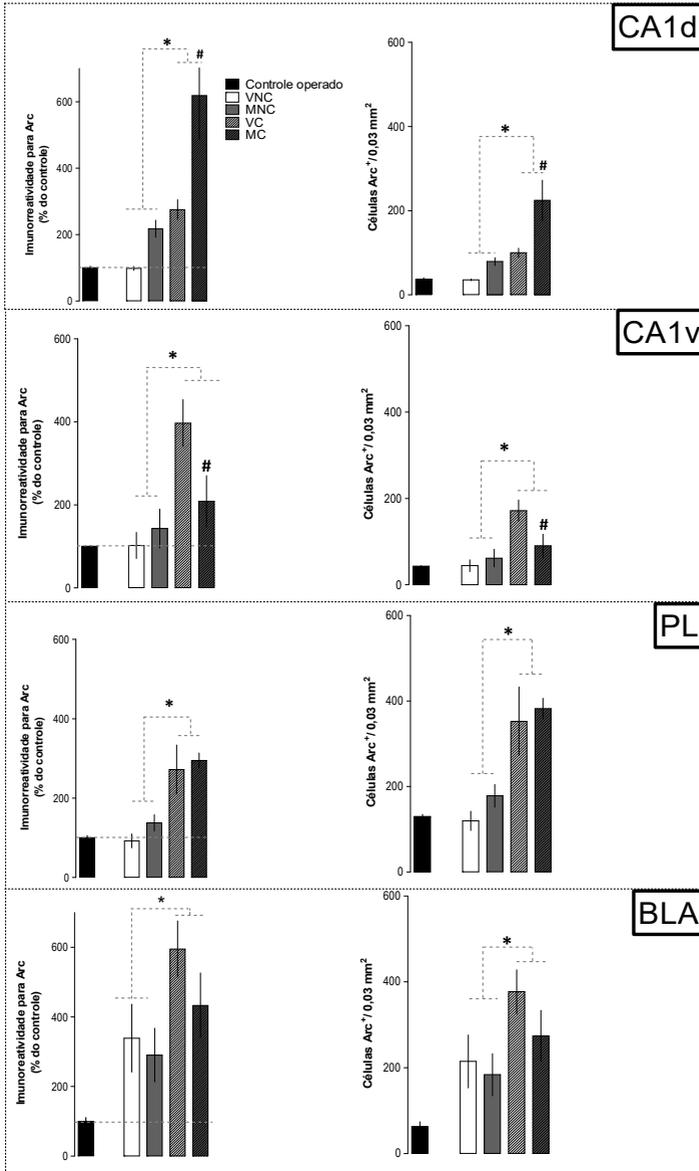
$P=,05$ ; CA1d -  $F_{1,8}=17,550$ ,  $P=,00304$ ; CA1v -  $F_{1,8}=12,593$ ,  $P=,00752$ ) (Figura 18). A única região que também apresentou um efeito significativo da injeção de muscimol no NR for a CA1 dorsal ( $F_{1,8}=11,232$ ,  $P=,01006$ ), muito embora não tenha havido uma interação entre os fatores ( $F_{1,8}=26325$ ,  $P=,14336$ ). Os animais que tiveram o NR inativado apresentaram um número significativamente maior de células Arc<sup>+</sup> do que os animais condicionados que receberam o veículo. Não houve diferença estatística entre os grupos de animais não condicionados. Já na região CA1 ventral, não houve um efeito significativo da injeção de muscimol no NR ( $F_{1,8}=2,1195$ ,  $P=,18353$ ), mas a ANOVA de duas vias indicou uma interação entre os dois fatores (condicionamento e injeção de muscimol,  $F_{1,8}=5,1057$ ,  $P=,05$ ). Os animais que tiveram o NR inativado logo após o condicionamento revelaram ter uma quantidade significativamente menor de células Arc<sup>+</sup> na região CA1 do hipocampo ventral, em comparação aos animais condicionados que receberam a injeção de veículo.





**Figura 17: Imagens representativas da imunomarcção para Arc nas 4 regiões encefálicas estudadas.** 1- Região CA1 do hipocampo dorsal, 2- Região CA1 do hipocampo ventral, 3- Porção pré-límbica do córtex pré-frontal medial; 4- Porção basolateral da amígdala. CO= controle operado; VNC= veículo não condicionado; MNC= muscimol não condicionado; VC= veículo condicionado; MC= muscimol condicionado. Escala = 15  $\mu$ m.

A <sup>24h</sup> → A-3EI <sup>90 minutos</sup> → Perfusão  
 Fam. Condicionamento



**Figura 18: Análise quantitativa da imunorreatividade para Arc nas diferentes regiões encefálicas estudadas.** Os animais foram separados em quatro grupos, sendo dois condicionados e dois não condicionados. Dentre os dois subgrupos, um deles recebeu veículo e um deles recebeu muscimol. Todos os animais dos 4 grupos foram perfundidos 90 minutos após a injeção central. A quantificação foi realizada utilizando imagens da reação de imunoistoquímica obtidas por microscopia. As barras pretas representam o grupo controle operado, que passou pela cirurgia estereotáxica, mas não foi manipulado experimentalmente nem recebeu quaisquer injeções centrais. Nos gráficos da esquerda, os valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de imunorreatividade para Arc em relação ao grupo controle operado. Nos gráficos da direita, os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM de células Arc<sup>+</sup> em 0,03 mm<sup>2</sup>. CA1d= região CA1 do hipocampo dorsal; CA1v= região CA1 do hipocampo ventral; PL= porção pré-límbica do córtex pré-frontal medial; BLA= região basolateral da amígdala; VNC= grupo veículo não condicionado; MNC= grupo muscimol não condicionado; VC= grupo veículo condicionado; MC= grupo muscimol condicionado. \* indica uma diferença significativa entre os grupos condicionados e não condicionados e # indica uma diferença significativa entre o grupo muscimol condicionado e o grupo veículo condicionado (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

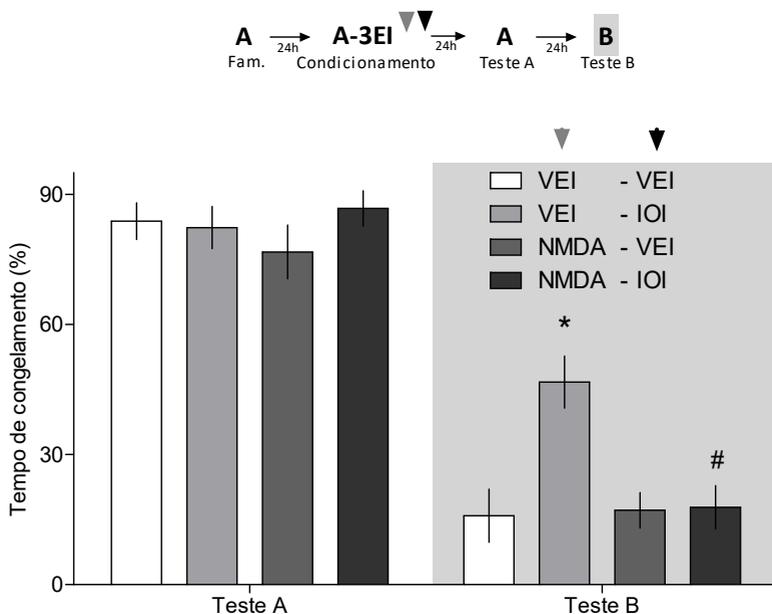
5.8. Efeitos da ativação de receptores NMDA do núcleo reuniens do tálamo (NR) durante a consolidação e a reconsolidação de uma memória aversiva consolidada sob a influência de hiperatividade adrenérgica sistêmica

Objetivando confirmar a participação do NR na consolidação de uma memória aversiva, utilizamos uma abordagem diferente dos experimentos anteriores, que utilizaram prioritariamente a inativação farmacológica através do agonismo GABA<sub>A</sub>. Com a estimulação da região através da injeção de NMDA, como em trabalhos prévios do laboratório (VANVOSSSEN et al., 2017), investigamos se a atividade do NR seria capaz de controlar a expressão generalizada de medo provocada pela hiperatividade adrenérgica durante a consolidação, um

efeito da ioimbina, um antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico (GAZARINI et al., 2014).

Num primeiro experimento, 33 animais foram alocados em 4 grupos experimentais ( $n= 8$  ou  $9$  por grupo), baseados na injeção central direcionada ao NR recebida após o condicionamento (veículo ou NMDA 100 pmol) e na injeção intraperitoneal recebida após a injeção central, ainda nos primeiros momentos da consolidação (veículo ou ioimbina 2 mg/kg). Estes animais foram submetidos ao condicionamento utilizando o treino forte e foram testados no contexto pareado (teste A) 24h após a sessão de condicionamento e no contexto não pareado (teste B) 48h após.

A ANOVA de duas vias indica um efeito significativo da injeção central de NMDA ( $F_{2,28}= 7,319$ ;  $P= 0,002$ ), da injeção intraperitoneal de ioimbina ( $F_{2,28}= 3,516$ ;  $P= 0,043$ ) e uma interação entre estes dois fatores ( $F_{2,28}= 12,089$ ;  $P= 0,0001$ ). O *post-hoc* de Newman-Keuls não revelou nenhuma diferença significativa entre os grupos quando testados no contexto pareado (teste A). No entanto, no contexto não pareado (teste B), o grupo VEI-IOI mostrou um aumento significativo no congelamento quando comparado com todos os outros grupos (Fig 19). O fato de o grupo NMDA-IOI não apresentar diferença significativa quanto aos grupos VEI-VEI e NMDA-VEI demonstra que a ativação dos receptores NMDA do NR após a aquisição foi capaz de prevenir a expressão generalizada de medo provocado pela hiperatividade noradrenérgica sistêmica causada pela administração de ioimbina.

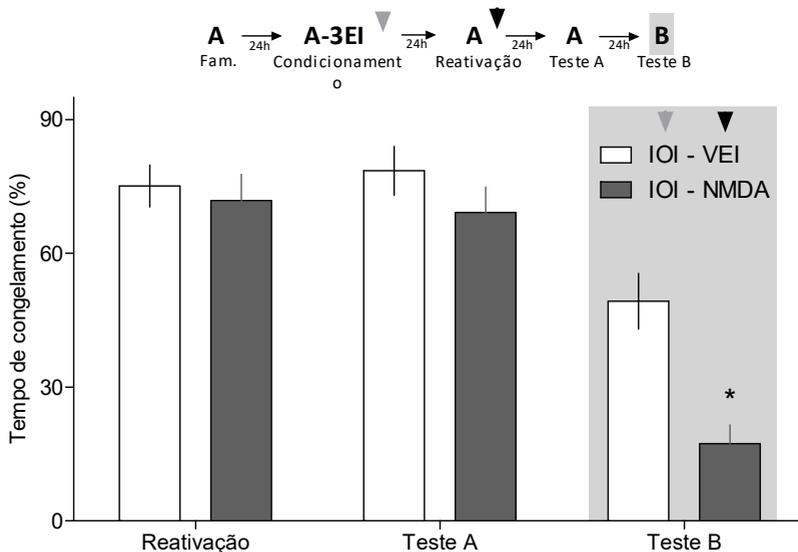


**Figura 19:** A ativação dos receptores NMDA do núcleo reunions (NR) do tálamo após a aquisição é capaz de prevenir a expressão generalizada de medo provocada pela administração sistêmica de ioimbina. Veículo (VEI) ou NMDA (100 pmol) foram injetados no NR logo após a sessão de condicionamento contextual. Veículo (VEI) ou ioimbina (IOI – 2mg/kg, i.p) foram administrados logo após a injeção central. As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (teste A) e não pareado (teste B) (VEI-VEI n=9; VEI-IOI n=8; NMDA-VEI n=8; NMDA-IOI n=8). \* indica uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle e # indica uma diferença significativa em relação ao grupo VEI-IOI (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Num segundo experimento, 17 animais foram distribuídos em 2 grupos (n= 8 ou 9 por grupo) baseados na injeção central direcionada ao NR recebida após uma sessão de reativação (veículo ou NMDA 100 pmol). Todos os animais receberam uma injeção de ioimbina 2 mg/kg após a sessão de condicionamento. O objetivo deste experimento é

investigar se a ativação do NR com NMDA durante a reconsolidação é capaz de resgatar a especificidade da memória de medo (inibir a expressão generalizada), perdida após a estimulação adrenérgica sistêmica provocada pela injeção intraperitoneal de ioimbina logo após o condicionamento. Estes animais foram submetidos ao condicionamento utilizando o treino forte e foram testados no contexto pareado (teste A) 24h após a sessão de reativação e no contexto não pareado (teste B) 48h após.

Uma ANOVA de medidas repetidas demonstra que não há nenhum efeito significativo nas porcentagens de congelamento observadas durante a sessão de reativação e no contexto pareado (teste A). No entanto, um teste “t” de Student demonstra que no contexto não pareado (teste B) os animais que receberam NMDA após a reativação expressaram níveis significativamente mais baixos de congelamento ( $t_{15} = -4,099$ ;  $P = 0,0009$ ) em relação aos animais do grupo IOI-VEI. Esse dado demonstra que a ativação dos receptores NMDA do NR após uma única sessão de reativação é capaz de inibir a expressão generalizada de medo causada pela hiperativação adrenérgica durante sua consolidação (Fig. 20).



**Figura 20:** A ativação dos receptores NMDA do núcleo reuniens (NR) do tálamo após a reativação é capaz de resgatar a especificidade de uma memória de medo cuja expressão generalizada foi induzida pela hiperatividade adrenérgica durante sua consolidação. Veículo (VEI) ou NMDA (100 pmol) foram injetados no NR logo após a sessão de reativação. Todos os animais receberam ioimbina na dose de 2 mg/kg logo após o condicionamento de medo. As setas indicam o momento dos tratamentos. Valores são expressos como média  $\pm$  EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (reativação e teste A) e não pareado (teste B) (VEI=IOI n=9; VEI-NMDA n=8). \* indica uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo VEI-IOI (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls e teste “t” de Student para amostras independentes).



## 6. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados sugerem que o NR do tálamo participa da consolidação de memórias aversivas influenciando características como especificidade contextual e persistência. Sua inatividade durante a consolidação provocou um aumento do tempo de congelamento observado no contexto não pareado (teste B) que se manteve ao menos até 22 dias após o condicionamento. Este dado indica a generalização inapropriada da expressão de medo, assim como demonstraram Xu e Südhof (2013) utilizando a inativação optogenética direta do NR ou o silenciamento dos aferentes provenientes do CPFm durante a aquisição de uma memória de medo. A participação dos núcleos da linha média do tálamo (reuniens e romboide) é tida como essencial para o controle dos níveis de atividade neuronal corticohipocampal durante os primeiros estágios da consolidação de uma memória (THIELEN et al., 2016) e uma menor interação funcional entre o CPFm e o HPC durante a consolidação de uma memória de valência emocional negativa em humanos foi relacionada a uma menor precisão da mesma (BERKERS et al., 2016). Com base nestes estudos e nos resultados deste trabalho, podemos pressupor que uma menor conectividade funcional entre o HPC e o CPFm provocada pela inatividade do NR durante a consolidação da memória aversiva levou à alteração da especificidade contextual dessa memória.

A atividade da amígdala sem o controle do CPFm via NR, também pode ter contribuído para a perda das características adaptativas

da memória (POULOS et al., 2009). O NR contribui também para o *replay* neuronal (ou disparo sucessivo de grupos de neurônios que foram recrutados durante a aquisição) necessário para a consolidação do engrama tanto durante o estado de vigília quanto durante o sono, o que o coloca em posição ideal para influenciar as características das informações que estão sendo consolidadas (GRIFFIN, 2015). O *replay* neuronal também está ligado a uma maior precisão da memória, já que a reativação sucessiva aumenta a conectividade neuronal intra-engrama, em detrimento da conectividade com neurônios que não foram recrutados durante a aquisição da memória (KARLSSON; FRANK, 2009).

O aumento da expressão de medo no contexto não pareado poderia também ser fruto de processos alheios ao processamento mnemônico como uma sensibilização comportamental dos animais após o condicionamento intenso, provocando o aumento de comportamentos tipo-ansioso e exploração reduzida (KINDT, 2014; PERUSINI et al., 2016). Além da observação da reprodução da expressão de medo generalizada no contexto não pareado mesmo 22 dias após o condicionamento, o que sugere fortemente que este efeito não foi causado por uma sensibilização comportamental, a exposição dos animais ao labirinto em cruz elevado também não trouxe à tona qualquer alteração nos comportamentos característicos dos roedores, como aumento de posturas de avaliação de risco e tempo gasto nos braços abertos do aparato, assim como não pudemos observar mudanças nos níveis de locomoção dos animais após a inativação do NR (inferido pela

ausência de diferença entre os grupos no número de entradas nos braços fechados).

A inatividade do NR também impediu uma queda nos níveis de congelamento no grupo muscimol 21 dias após o condicionamento. Estudos eletrofisiológicos apontam o NR como uma região importante para a sincronização entre HPC e CPFm durante a aquisição e consolidação de diversos tipos de memórias, exercendo um controle fino do balanço na ativação de neurônios excitatórios e inibitórios nessas regiões (HALLOCK et al., 2016; HARTUNG et al., 2016). No caso de memórias espaciais, lesões direcionadas aos núcleos da linha média do tálamo não preveniram a aquisição da informação espacial, mas prejudicaram sua persistência, já que não houve sinais de expressão dessa memória 25 dias depois (LOUREIRO et al., 2012; DOLLEMAN-VAN DER WEEL et al., 2009). No nosso caso, a persistência pode ter se mostrado aumentada por tratar-se de uma memória contextual, que engloba componentes emocionais além das informações espaciais e possui características neurobiológicas diferentes. Alternativamente, é importante lembrar que nosso protocolo inclui uma etapa de familiarização que permite a aquisição de uma representação contextual antes do condicionamento, quando estas mesmas informações serão reativadas e associadas ao recebimento do estímulo incondicionado, gerando o comportamento de medo frente ao contexto. Assim, nossos animais provavelmente já retêm a informação contextual referente ao contexto consolidada tanto no HPC quanto no CPFm (TSE et al., 2007; VAN KESTEREN, 2010) no momento do condicionamento. A

persistência torna-se aumentada, então, por uma possível incongruência entre as informações contextuais já existentes e as que estão sendo consolidadas logo após o condicionamento, devido à falta de coordenação ou controle do NR sobre a reativação do traço pré-existente e a associação com a nova informação representada pelo estímulo incondicionado. Assim, seu “esquecimento” ou extinção naturais ficam prejudicados (PITMAN, 1989). O mesmo processo poderia explicar a generalização das respostas de medo observadas no contexto não pareado. Para testar esta hipótese, em um experimento separado, os animais foram familiarizados e condicionados em sessão única, ou seja: foram expostos pela primeira vez ao contexto A por três minutos, e aos 3 minutos e 30 segundos, receberam o primeiro choque de três com intervalos de 30 segundos entre cada choque. Assim, a representação contextual não teria tempo de ser consolidada antes do condicionamento. A inativação do NR logo após esse condicionamento precedido imediatamente pela familiarização não teve qualquer efeito tanto na reexposição ao contexto pareado 24h após o condicionamento, quanto na exposição ao contexto não pareado 48h depois, já que não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos nos dois testes. Embora não tenha sido feito mais remotamente (testes após 21 dias), este experimento suporta a ideia de que o NR é importante apenas quando a tarefa depende da estreita comunicação entre HPC e CPF, hipótese que já foi levantada e experimentalmente testada previamente, com conclusões muito semelhantes (LEAL et al., 2017; CAREAGA et al., 2016; SACHSER et al., 2016. CASSEL; PEREIRA DE VASCONCELOS, 2015; CHOLVIN et al., 2013; CROSS et al., 2012).

Em relação aos grupos não condicionados, a expressão de células Arc<sup>+</sup> aumentou nas quatro regiões encefálicas avaliadas nos dois grupos de animais que foram condicionados. No entanto, o número de células Arc<sup>+</sup> na amígdala basolateral e no córtex pré-límbico foi semelhante nos grupos condicionados e tratados com veículo ou muscimol, sugerindo que a plasticidade sináptica nessas duas regiões independe da atividade no núcleo reuniens. Já as regiões CA1 dorsal e ventral do hipocampo sofreram alterações na expressão de Arc dependentes da atividade do NR. Enquanto na região dorsal houve aumento no número de células positivas, na região ventral houve um decréscimo significativo em relação ao grupo veículo condicionado. As diferenças observadas entre as regiões dorsal e ventral do HPC podem ser explicadas por suas diferenças de conectividade funcional com o NR e outras regiões. Ao inativar farmacologicamente o NR, o controle exercido pelo CPFm sobre o recrutamento neuronal no HPC dorsal parece ter diminuído consideravelmente, o que provocou um aumento no número de células envolvidas da formação da memória de medo. A amígdala, por sua vez, pode ter favorecido uma maior ativação dos neurônios na região dorsal ao ser capaz de agir sobre ela sem a intervenção do CPFm (HUFF et al., 2006). Já o HPC ventral seria bastante dependente da atividade do núcleo reuniens, uma vez que os eferentes do NR que chegam a essa região são até 10x mais numerosos do que os direcionados à região CA1 dorsal (MCKENNA; VERTES, 2004). Assim, o número de células Arc<sup>+</sup> nessa região pode ter diminuído em função da inatividade provocada pelo muscimol. Ainda, segundo os estudos de Cullen e colaboradores (2015), quando a memória é

expressa, o HPC ventral trabalha em conjunto com o CPF (em especial o córtex anterior cingulado) e a amígdala para modular a expressão generalizada do medo. Uma vez que a consolidação fica prejudicada no HPC ventral pela inatividade do NR, o controle da expressão generalizada quando da exposição dos animais condicionados aos contextos pareado e não pareado pode encontrar-se prejudicada, provocando as alterações comportamentais observadas. As conexões entre amígdala e HPC ventral também são reconhecidas por integrar informações emocionais e contextuais durante o aprendizado, o que subsidia sua participação no controle da expressão de medo generalizada (XU et al., 2016; YUAN et al., 2015; FANTIN et al., 2013; PITKANEN et al., 2000). Já o aumento da persistência e a resistência à labilização e interferência farmacológica talvez possam ser explicados pelo maior recrutamento plástico neuronal na região CA1 dorsal, o que tornaria o engrama menos específico (RASHID et al., 2016; ZELIKOSKY et al., 2014).

Os animais dos grupos controle e muscimol aprendem a inibir o comportamento de medo de forma bastante semelhante, quando reexpostos de forma prolongada ao estímulo condicionado. No entanto, quando da exposição ao contexto pareado 24h após a sessão de extinção, os animais que tiveram o NR inativado durante a consolidação da memória de medo apresentaram níveis aumentados de congelamento em relação ao grupo controle. Este dado indica que os animais que consolidaram a memória de medo com o NR inativado tiveram dificuldades em 1) labilizar e realizar o *update* da memória aversiva original, 2) consolidar a memória de extinção em associação à memória de medo original e/ou 3) suprimir a expressão comportamental da

memória de medo, mesmo após a aquisição da memória de extinção. Um déficit de aprendizado associativo na extinção, que pode ter levado a uma dificuldade de supressão da resposta condicionada na reexposição ao contexto pareado, pode estar relacionada à formação de um traço de memória mais generalizado após a inativação do NR. A incongruência dos traços entre HPC e CPF pode afetar a labilização da memória de medo, e assim impedir seu *updating* (LEE et al., 2016). Trabalhos recentes demonstram a importância da ocorrência de uma labilização sistêmica para a desestabilização eficiente da memória (DE OLIVEIRA ALVARES et al., 2013; PIÑEYRO et al., 2014; LUX et al., 2015). Um traço generalizado, portanto, não seria tão facilmente labilizado. Ainda, e de forma complementar, um maior recrutamento neuronal durante a consolidação, causado pelo menor controle do NR sobre a ativação neuronal durante a consolidação do traço de memória na região dorsal do HPC, pode prejudicar o aprendizado de extinção e tornar a memória original menos suscetível à inibição, uma vez que este é contexto-dependente (BOUTON, 2004). Alternativamente, é possível que uma sessão mais longa ou um maior número de sessões de extinção levassem a inibição comportamental da memória de medo nos animais que tiveram o NR inativado aos mesmos níveis dos animais pertencentes ao grupo controle (SUZUKI et al., 2004; ISHIKAWA et al., 2016). No entanto, ainda assim seria evidente uma maior dificuldade de extinção dos animais pertencentes ao grupo muscimol.

A memória consolidada sob a inativação farmacológica do NR também demonstrou ser menos suscetível à interferência farmacológica durante a reconsolidação. A clonidina, um fármaco reconhecidamente

amnésico (GAMACHE et al., 2012; GAZARINI et al., 2013; 2014; MARIN, 2017), foi incapaz de reduzir as respostas de medo condicionadas ao ser utilizado após a reexposição dos animais pertencentes ao grupo muscimol ao contexto pareado com o intuito de reativar e desestabilizar a memória de medo. Já os animais que não tiveram o NR inativado durante a consolidação apresentaram uma queda significativa nas porcentagens de tempo de congelamento após a intervenção com clonidina. Este dado, em conjunto com os dados dos grupos não reativados, indica que a reativação provocada por 3 minutos de exposição ao contexto pareado foi suficiente para reativar e labilizar a memória de medo somente no grupo controle. Assim, podemos supor que os animais cujo NR esteve inativado durante a consolidação apresentam uma falha de labilização da memória de medo, o que impediu o sucesso da intervenção farmacológica. Outros autores reportam a ocorrência de resistência à intervenção induzida pela reativação também em animais cuja memória foi consolidada sob influência de estresse e hiperatividade adrenérgica sistêmica (ESPEJO et al., 2016; GAZARINI et al., 2014). No nosso caso, a aparente falha de labilização que levou ao insucesso da ação da clonidina após a reativação pode ter sido provocada pela consolidação generalizada do traço mnemônico devido à inativação do NR. Assim, a labilização necessária para o seu *updating* não acontece ou é deficitária/parcial, impedindo a ação da clonidina sobre a memória.

Xu e Südhof (2013) também descreveram o aumento da especificidade da memória contextual com a estimulação optogenética tônica do NR durante a aquisição da memória de medo. No presente trabalho, a estimulação glutamatérgica do NR com o agonista NMDA

foi capaz de manter a especificidade de uma memória de medo mesmo após a indução da hiperatividade adrenérgica sistêmica pela injeção do antagonista  $\alpha_2$  ioimbina, uma ferramenta utilizada pelo nosso laboratório para a indução e o estudo de respostas de medo generalizadas (O'DONNELL et al., 2004; GAZARINI, 2014; MARIN, 2017). A estimulação do NR sem a injeção intraperitoneal de ioimbina parece não ter provocado alterações comportamentais nem no contexto pareado, nem no contexto não pareado. Enquanto isso, os animais que receberam a ioimbina e não tiveram o NR estimulado apresentaram um aumento da expressão generalizada do comportamento de medo no contexto não pareado, em acordo com trabalhos prévios do nosso grupo (GAZARINI, 2014; MARIN, 2017), mas o mesmo não foi observado nos animais que tiveram o NR estimulado com NMDA antes da injeção de ioimbina. Assim, a estimulação farmacológica parece ter resgatado a especificidade contextual da memória de medo ao aumentar o controle desta região sobre a consolidação e a reconsolidação associativas dos engramas no HPC e no CPFm. Isso aconteceria porque as fibras provenientes do NR são predominantemente excitatórias, mas inervam tanto neurônios excitatórios quanto interneurônios inibitórios, levando a um controle seletivo do engrama, em acordo com a hipótese da alocação e competição entre engramas (RASHID et al., 2016).

Em humanos, estudos recentes têm correlacionado disfunções na circuitaria de processamento contextual - incluindo o HPC, o CPFm, o tálamo e a amígdala - à patofisiologia do TEPT, incluindo o surgimento de alterações descritas em estudos com seres humanos e

animais, incluso o presente: generalização inapropriada, extinção deficitária e persistência aumentada (LIBERZON; ABELSON, 2016).

Em suma, o NR parece estar intimamente envolvido no controle de precisão contextual e persistência de memórias de medo, aprendizado de extinção e intervenção durante a reconsolidação. Estes efeitos parecem estar relacionados à conectividade funcional entre o NR, as porções dorsal e ventral do HPC e o CPFm durante a consolidação da memória de medo, e principalmente ao controle do NR sobre a plasticidade sináptica e os engramas que se formam nessas regiões (JIN; MAREN, 2015; ANDERSON et al., 2016).

## 7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os experimentos comportamentais que compõe essa dissertação demonstram claramente a participação do núcleo reuniens do tálamo durante a etapa de consolidação de memórias aversivas. Muito embora a expressão da memória não tenha sido afetada 24 horas após o aprendizado, testes subsequentes demonstraram que a atividade do NR afeta a forma como a memória é armazenada, e conseqüentemente sua generalização, reconsolidação, labilização e extinção. A inalteração dos parâmetros comportamentais no labirinto em cruz elevado após o condicionamento seguido da inativação do NR aponta ainda mais para um efeito específico dessa região sobre o processamento mnemônico. Já o experimento de imunistoquímica pode ser considerado preliminar, mas traz informações sobre a influência do NR do tálamo sobre a plasticidade em regiões importantes para o processamento mnemônico, e por isso compõe este trabalho. Em suma, tivemos a oportunidade de explorar a influência da atividade do NR em diversas características das memórias aversivas, com resultados muitas vezes surpreendentes e que, segundo nossos estudos, ainda não haviam sido descritos na literatura científica.

De forma geral, os dados aqui apresentados contribuem para um melhor entendimento do processamento mnemônico, assim como sobre a neurobiologia por trás da formação e expressão de memórias. Além disso, tentam abrir portas para estudos futuros interessados no entendimento de tais questões. Muito mais pode ser feito visando esse objetivo.



## 8. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM WC, WILLIAMS JM. 2008. LTP maintenance and its protein synthesis dependence. *Neurobiol Learn Mem.* 89 (3): 260-8.
- ALBERINI CM. 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes?. *Trends Neurosci.* 28(1):51-6
- ALVAREZ RP, BIGGS A, CHEN G, PINE DS, GRILLON C. 2008. Contextual fear conditioning in humans: cortical-hippocampal and amygdala contributions. *J Neurosci.* 28, 6211–6219.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. 2013. The diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM 5. Washington, DC.
- ANDERSON MC, BUNCE JG, BARBAS, H. 2015. Prefrontal-hippocampal pathways underlying inhibitory control over memory. *Neurobiol Learn Mem.* 134, 145-161.
- ANTONIADIS EA, MCDONALD RJ. 2006. Fornix, medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and mediodorsal thalamic nucleus: roles in a fear-based context discrimination task. *Neurobiol Learn Mem.* 85, 71–85.
- BARKER GRI, WARBURTON EC. 2008. NMDA receptor plasticity in the perirhinal and prefrontal cortices is crucial for the acquisition of long-term object-in-place associative memory. *J. Neurosci.* 28, 2837–2844.
- BEN MAMOU C, GAMACHE K, NADER K. 2006. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nat Neurosci.* 9(10):1237-9.

- BENCHENANE K, PEYRACHE A, KHAMASSI M, TIERNEY PL, GIOANNI Y, BATTAGLIA FP, WIENER SI. 2010. Coherent theta oscillations and reorganization of spike timing in the hippocampal-prefrontal network upon learning. *Neuron*. 66(6):921-36.
- BERKERS RM, KLUMPERS F, FERNÁNDEZ G. 2016. Medial prefrontal-hippocampal connectivity during emotional memory encoding predicts individual differences in the loss of associative memory specificity. *Neurobiology of learning and memory*. 134:44-54.
- BERTRAM EH, ZHANG DX. 1999. Thalamic excitation of hippocampal CA1 neurons: a comparison with the effects of CA3 stimulation. *Neuroscience*. 92, 15–26.
- BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC. 1969. Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol*. 67, 370–375.
- BLANCHARD RJ, YANG M, LI CI, GERVACIO A, BLANCHARD DC. 2001. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 25(7): 587-595.
- BLISS TV, LØMO T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 232: 331–356.
- BRAMHAM CR, WORLEY PF, MOORE MJ, GUZOWSKI JF. 2008. The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function." *J Neurosci*. 46: 11760-11767.
- BRISCIONE MA, JOVANOVIĆ T, NORRHOLM SD. 2014. Conditioned fear associated phenotypes as robust, translational indices of trauma-, stressor-, and anxiety-related behaviors. *Front Psychiatry*. 5:88.

- BOUTON ME. 1993. Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull.* 114: 80–99.
- BOUTON ME, MINEKA S, BARLOW DH. 2001. A modern learning theory perspective on the etiology of panic disorder. *Psychol Rev.* 108:4-32.
- BUSTOS SG, GIACHERO M, MALDONADO H, MOLINA VA. 2010. Previous stress attenuates the susceptibility to midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-reactivation D-Cycloserine administration. *Neuropsychopharmacology.* 35: 1097-1108.
- CAREAGA MBL, GIRARDI CEN, SUCHECKI D. 2016. Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 71: 48-57.
- CASSEL JC, PEREIRA DE VASCONCELOS A. 2015. Importance of the ventral midline thalamus in driving hippocampal functions. *Progress in brain research.* 219: 145-161
- CHOLVIN T, LOUREIRO M, CASSEL R, COSQUER B, GEIGER K, DE SA NOGUEIRA D, RAINGARD H, ROBELIN L, KELCHE C, PEREIRA DE VASCONCELOS A, CASSEL JC. 2013. The ventral midline thalamus contributes to strategy shifting in a memory task requiring both prefrontal and hippocampal functions. *J. Neurosci.* 33(20): 8772-8783.
- CORCORAN KA; MAREN S. 2004. Factors regulating the effects of hippocampal inactivation on renewal of conditional fear after extinction. *Learn. Mem.* 11: 598-603.

CROSS L, BROWN M, AGGLETON J. 2012. The medial dorsal thalamic nucleus and the medial prefrontal cortex of the rat function together to support associative recognition and recency but not item recognition. *Learn. Mem.* 20: 41-51.

CULLEN PK, GILMAN TL, WINIECKI P, RICCIO DC, JASNOW AM. 2015. Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. *Neurobiology of learning and memory.* 124:19-27.

DAVOODI FG, MOTAMEDI F, AKBARI E, GHANBARIAN E, JILA B. 2011. Effect of reversible inactivation of reuniens nucleus on memory processing in passive avoidance task. *Behavioural Brain Research.* 221(1): 1–6.

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

DEBIEC J; LEDOUX JE. 2004. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neuroscience.* 129(2): 267-272.

DELGADO MR, NEARING KI, LEDOUX JE, PHELPS EA. 2008. Neural circuitry underlying the regulation of conditioned fear and its relation to extinction. *Neuron.* 59(5): 829-838.

DI PRISCO GV, VERTES RP. 2006. Excitatory actions of the ventral midline thalamus (rhomboid/reuniens) on the medial prefrontal cortex in the rat. *Synapse.* 60(1): 45-55.

DOLLEMAN-VAN DER WEEL MJ, LOPES DA SILVA FH, WITTER MP. 1997. Nucleus reuniens thalami modulates activity in hippocampal field CA1 through excitatory and inhibitory mechanisms. *J. Neurosci.* 17: 5640–5650.

DOLLEMAN-VAN DER WEEL MJ, MORRIS RGM, WITTER MP. 2009. Neurotoxic lesions of the thalamic reuniens or mediodorsal nucleus in rats affect non-mnemonic aspects of water-maze learning. *Brain Struct. Funct.* 213: 329-342.

DUDAI Y. 2002. Memory from A to Z: keywords, concepts, and beyond. Oxford University Press.

DUDAI Y. 2012. The restless engram: consolidations never end. *Annual review of neuroscience.* 35: 227-247.

DUDAI Y, EISENBERG M. 2004. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron.* 44(1): 93-100.

DUDAI Y, MORRIS RGM. 2000. To consolidate or not to consolidate: What are the questions? *In Brain, perception, memory advances in cognitive sciences.* 149–162. Oxford University Press, Oxford.

DUDAI Y, MORRIS RGM. 2013. Memorable trends. *Neuron.* 80(3): 742-750.

DUIJS P, CATH DC, LISSEK S, HOX JJ, HAMM AO, ENGELHARD IM, BAAS JM. 2015. Updated meta-analysis of classical fear conditioning in the anxiety disorders. *Depression and anxiety.* 32(4): 239-253.

DUNSMOOR J, PAZ R. 2015. Fear generalization and anxiety: behavioral and neural mechanisms. *Biol. Psych.* 78 (5):336-343.

ESPEJO PJ, ORTIZ V, MARTIJENA ID, MOLINA VA. 2016. Stress-induced resistance to the fear memory labilization/reconsolidation process. Involvement of the basolateral amygdala complex. *Neuropharmacology*. 109: 349-56.

EUSTON DR, GRUBER AJ, MCNAUGHTON BL. 2012. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron*. 76(6): 1057-70.

FANSELOW MS. 1980. Conditioned and unconditional components of post- shock freezing. *Pavlov J Biol Sci*. 15: 177-182.

FANSELOW MS. 1994. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychonomic Bulletin & Review*. 1(4): 429-438.

FANTIN M, VAN DER KOOIJ MA, GROSSE J, KRUMMENACHER C, SANDI C. 2013. A key role for nectin-1 in the ventral hippocampus in contextual fear memory. *PLoS One*. 8(2):e56897.

FENDT Á, FANSELOW MS. 1999. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 23(5): 743-760.

FINNIE P, NADER K. 2012. The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation. *Neurosci Biobehav Rev*. 36: 1667–1707.

FRANKLAND PW, BONTEMPI B. 2005. The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*. 6(2): 119-30.

FRANKLAND PW, BONTEMPI B, TALTON LE, KACZMAREK L, SILVA AJ. 2004. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*. 304: 881–883.

- GARDNER AJ, GRIFFITHS J. 2014. Propranolol, post-traumatic stress disorder, and intensive care: incorporating new advances in psychiatry into the ICU. *Critical Care*. 18(6): 1.
- GARFINKEL SN, ABELSON JL, KING AP, SRIPADA RK, WANG X, GAINES LM, LIBERZON I. 2014. Impaired contextual modulation of memories in PTSD: an fMRI and psychophysiological study of extinction retention and fear renewal. *The Journal of Neuroscience*. 34(40): 13435-13443.
- GAZARINI L, STERN CA, PIORNEDO RR, TAKAHASHI RN, BERTOGLIO LJ. 2014. PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. *Int J Neuropsychopharmacol*. 18(1): pyu026.
- GHOSH S, CHATTARJI S. 2014. Neuronal encoding of the switch from specific to generalized fear. *Nat. Neurosci*. 18: 112–120.
- GOSHEN I, BRODSKY M, PRAKASH R, WALLACE J, GRADINARU V, RAMAKRISHNAN C, DEISSEROTH K. 2011. Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell*. 147: 678–689.
- GUITTON MJ, DUDAI Y. 2004. Anxiety-like state associates with taste to produce conditioned taste aversion. *Biological psychiatry*, 56(11), 901-904.
- GUTTMAN N, KALISH HI. 1956. Discriminability and stimulus generalization. *J Experim Psych*. 51:79-88.
- GRIFFIN AL. 2015. Role of the thalamic nucleus reuniens in mediating interactions between the hippocampus and medial prefrontal cortex

during spatial working memory. *Frontiers in systems neuroscience*. 10;9: 29.

GRILLON C, MORGAN CA. 1999. Fear-potentiated startle conditioning to explicit and contextual cues in gulf war veterans with posttraumatic stress disorder. *J Abnorm Psychol*. 108: 134–142.

GUAN JS, JIANG J, XIE H, LIU KY. 2016. How Does the Sparse Memory “Engram” Neurons Encode the Memory of a Spatial–Temporal Event?. *Frontiers in Neural Circuits*. 10.

HAUBRICH J, CRESTANI AP, CASSINI LF, SANTANA F, SIERRA RO, DE O ALVARES L, QUILLFELDT JA. 2015. Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology*. 40(2): 315-26.

HAUBRICH J, CASSINI LF, DIEHL F, SANTANA F, FÜRSTENAU DE OLIVEIRA L, DE OLIVEIRA ALVARES L, QUILLFELDT JA. 2016. Novel learning accelerates systems consolidation of a contextual fear memory. *Hippocampus*. 26(7): 924-32.

HUFF NC, FRANK M, WRIGHT-HARDESTY K, SPRUNGER D, MATUS-AMAT P, HIGGINS E, RUDY JW. 2006. Amygdala regulation of immediate-early gene expression in the hippocampus induced by contextual fear conditioning. *Journal of Neuroscience*. 26(5): 1616-23.

ONAT S, BÜCHEL C. 2015. The neuronal basis of fear generalization in humans. *Nature Neuroscience*.

- HALLOCK HL, WANG A, GRIFFIN AL. 2016. Ventral Midline Thalamus Is Critical for Hippocampal–Prefrontal Synchrony and Spatial Working Memory. *Journal of Neuroscience*. 36(32): 8372-89.
- HALLOCK HL, WANG A, SHAW CL, GRIFFIN AL. 2013. Transient inactivation of the thalamic nucleus reuniens and rhomboid nucleus produces deficits of a working-memory dependent tactile-visual conditional discrimination task. *Behav. Neurosci.* 127(6): 860–866.
- HARTUNG H, BROCKMANN MD, PÖSCHEL B, DE FEO V, HANGANU-OPATZ IL. 2016. Thalamic and Entorhinal Network Activity Differently Modulates the Functional Development of Prefrontal–Hippocampal Interactions. *Journal of Neuroscience*. 36(13): 3676-90.
- HEBB DO. 1949. *The Organisation of Behaviour*. New York: Wiley
- HEMBROOK JR, MAIR RG. 2011. Lesions of reuniens and rhomboid thalamic nuclei impair radial maze win-shift performance. *Hippocampus*. 21: 815–826.
- HEMBROOK JR, ONOS KD, MAIR RG. 2012. Inactivation of ventral midline thalamus produces selective spatial delayed conditional discrimination impairment in the rat. *Hippocampus*. 22: 853-860.
- HERMANN C, ZIEGLER S, BIRBAUMER N, FLOR H. 2002. Psychophysiological and subjective indicators of aversive pavlovian conditioning in generalized social phobia. *Biol Psychiatry*. 52(4): 328–337.
- HERMANS D, CRASKE MG, MINEKA S, LOVIBOND PF. 2006. Extinction in human fear conditioning. *Biol Psychiatry*. 60(4): 361e368.

HOOVER WB, VERTES RP. 2012. Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. *Brain Struct. Funct.* 217: 191–209.

HUNSAKER MR, KESNER RP. 2008. Dissociations across the dorsolventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear. *Neurobiol. Learn. Mem.* 89: 61–69.

ISHIKAWA R, FUKUSHIMA H, FRANKLAND PW, KIDA S. 2016. Hippocampal neurogenesis enhancers promote forgetting of remote fear memory after hippocampal reactivation by retrieval. *eLife.* 5: e17464.

JAROME TJ, FERRARA NC, KWAPIS JL, HELMSTETTER FJ. 2015. Contextual Information Drives the Reconsolidation-Dependent Updating of Retrieved Fear Memories. *Neuropsychopharmacology.* 40(13): 3044-3052.

JIN J, MAREN S. 2015. Prefrontal-hippocampal interactions in memory and emotion. *Frontiers in systems neuroscience.* 9.

JOVANOVIC T, NORRHOLM SD, FENNELL JE, KEYES M, FIALLOS AM, MYERS KM, DAVIS M, DUNCAN EJ. 2009. Posttraumatic stress disorder may be associated with impaired fear inhibition: Relation to symptom severity. *Psychiatry Res.* 167: 151–160.

JOVANOVIC T, KAZAMA A, BACHEVALIER J, DAVIS M. 2012. Impaired safety signal learning may be a biomarker of PTSD. *Neuropharmacology.* 62(2): 695-704.

JOVANOVIC T, RESSLER KJ. 2010. How the neurocircuitry and genetics of fear inhibition may inform our understanding of PTSD. *Am J Psych.* 167: 648-662.

- KAOUANE N, PORTE Y, VALLÉE M, BRAYDA-BRUNO L, MONS N, CALANDREAU L, MARIGHETTO A, PIAZZA PV, DESMEDT A. 2012. Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. *Science*. 335(6075): 1510-1513.
- KAWASHIMA T, OKUNO H, BITO H. 2014. A new era for functional labeling of neurons: activity-dependent promoters have come of age. *Frontiers in Neural Circuits*. 8: 37.
- KINCHESKI GC, MOTA-ORTIZ SR, PAVESI E, CANTERAS NS, CAROBREZ AP. 2012. The dorsolateral periaqueductal gray and its role in mediating fear learning to life threatening events. *PLoS One*. 7(11): e50361.
- KINDT M. 2014. A behavioral neuroscience perspective on the aetiology and treatment of anxiety disorders. *Behav. Res. Ther.* 62: 24-36.
- KINDT M, SOETER M, VERVLIIET B. 2009. Beyond extinction: erasing human fear responses and preventing the return of fear. *Nature neuroscience*. 12(3): 256-258.
- KHALAF O, GRÄFF J. 2016. Structural, Synaptic, and Epigenetic Dynamics of Enduring Memories. *Neural Plasticity*.
- KJELSTRUP KG, TUVNES FA, STEFFENACH HA, MURISON R, MOSER EI, MOSER MB. 2002. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 10825–10830.
- KORB E, FINKBEINER S. 2011. Arc in synaptic plasticity: From gene to behavior. *Trends in Neurosciences*. 34(11): 591–598.

- KUBIK S, MIYASHITA T, KUBIK-ZAHORODNA A, GUZOWSKI JF. 2012. Loss of activity-dependent Arc gene expression in the retrosplenial cortex after hippocampal inactivation: Interaction in a higher-order memory circuit. *Neurobiology of Learning and Memory*. 97(1): 124–131.
- LASHLEY KS, WADE M. 1946. The Pavlovian theory of generalization. *Psych Review*. 53: 72-87
- LECHNER HA, SQUIRE LR, BYRNE JH. 1999. 100 years of consolidation—Remembering Müller and Pilzecker. *Learn Mem*. 2: 77–87.
- LEAL SL, NOCHE JA, MURRAY EA, YASSA MA. 2017. Age-related individual variability in memory performance is associated with amygdala-hippocampal circuit function and emotional pattern separation. *Neurobiology of Aging*. 49: 9-19.
- LEDOUX JE. 2009. Emotion circuits in the brain. *Focus*. 7(2): 274-274.
- LEE HJ, HABERMAN RP, ROQUET RF, MONFILS MH. 2016. Extinction and Retrieval+ Extinction of Conditioned Fear Differentially Activate Medial Prefrontal Cortex and Amygdala in Rats. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 9.
- LEE SH, CHOI JH, LEE N, LEE HR, KIM JI, YU NK, CHOI SL, LEE SH, KIM H, KAANG BK. 2008. Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science*. 319(5867): 1253-6.
- LEWIS DJ. 1979. Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol Bull*. 86: 1054-1083.
- LIBERZON I, ABELSON JL. 2016. Context processing and the neurobiology of post-traumatic stress disorder. *Neuron*. 92(1): 14-30.

- LI Y, PEHRSON AL, WALLER, JA, DALE E, SANCHEZ C, GULINELLO M. 2015. A critical evaluation of the activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc/Arg3.1)'s putative role in regulating dendritic plasticity, cognitive processes, and mood in animal models of depression. *Frontiers in Neuroscience*. 9.
- LISSEK S. 2012. Toward an account of clinical anxiety predicated on basic, neurally mapped mechanisms of pavlovian fear-learning: The case for conditioned overgeneralization. *Depress Anxiety*. 29: 257-263.
- LISSEK S, POWERS AS, MCCLURE EB. 2005. Classical fear conditioning in the anxiety disorders: a meta-analysis. *Behav Res Ther*. 43(11):1391–1424.
- LOUREIRO M, CHOLVIN T, LOPEZ J, MERIENNE N, LATRECHE A, COSQUER B, GEIGER K, KELCHE C, CASSEL JC, PEREIRA DE VASCONCELOS A. 2012. The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory in rats. *J. Neurosci*. 32 (29): 9947-9959.
- LÜSCHER C, MALENKA RC. 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1; 4(6).
- LUX V, MASSECK OA, HERLITZE S, SAUVAGE MM. 2015. Optogenetic Destabilization of the Memory Trace in CA1: Insights into Reconsolidation and Retrieval Processes. *Cerebral Cortex*. 29: bhv282.
- MALDONADO NM, MARTIJENA ID, MOLINA VA. 2011. Facilitating influence of stress on the consolidation of fear memory induced by a weak training: Reversal by midazolam pretreatment. *Behavioural brain research*. 225(1): 77-84.

MAREN, S, HOLT WG. 2004. Hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats: muscimol infusions into the ventral, but not dorsal, hippocampus impair the acquisition of conditional freezing to an auditory conditional stimulus. *Behav. Neurosci.* 118: 97–110.

MARIN, FN. 2017. Efeito de intervenções farmacológicas antes e/ou após a expressão generalizada de medo sobre a memória aversiva original em ratos. Dissertação de Mestrado em Farmacologia. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MCKENNA JT, VERTES RP. 2004. Afferent projections to reuniens nucleus of the thalamus. *J. Comp. Neurol.* 480: 115–142.

MERLO E, MILTON AL, GOOZÉE ZY, THEOBALD DE, EVERITT BJ. 2014. Reconsolidation and extinction are dissociable and mutually exclusive processes: behavioral and molecular evidence. *J Neurosci.* 34(7): 2422-2431.

MILNER B, CORKIN S, TEUBER HL. 1968. Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome: 14-year follow-up study of HM. *Neuropsychologia.* 6(3): 215-234.

MINEKA S, OEHLBERG K. 2008. The relevance of recent developments in classical conditioning to understanding the etiology and maintenance of anxiety disorders. *Acta Psychol.* 127(3): 567– 580.

MILAD MR, RAUCH SL, PITMAN RK, QUIRK GJ. 2006. Fear extinction in rats: Implications for human brain imaging and anxiety disorders. *Biological Psychology.* 73(1): 61e71.

MILAD MR, ROSENBAUM BL, SIMON NM. 2014. Neuroscience of fear extinction: implications for assessment and treatment of fear-based

and anxiety related disorders. *Behaviour research and therapy*. 62: 17-23.

MISANIN JR, MILLER RR, LEWIS DJ. 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*. 160: 554–555.

MOCHNY CR, KINCHESKI GC, MOLINA VA, CAROBREZ AP. 2013. Dorsolateral periaqueductal gray stimulation prior to retrieval potentiates a contextual fear memory in rats. *Behav Brain Res*. 237:76-81.

MORALES GJ, RAMCHARAN EJ, SUNDARARAMAN N, MORGERA SD, VERTES R. 2007. Analysis of the actions of reuniens nucleus and the entorhinal cortex on EEG and evoked population behavior of the hippocampus. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc*. 2007: 2480-2484.

MORRIS RG. 2006. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *European Journal of Neuroscience*. 23(11): 2829-46.

MOSER MB, MOSER EI, FORREST E, ANDERSEN P, MORRIS RG. 1995. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9697–9701.

MOSER MB, MOSER EI. 1998. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*. 8(6): 608-619

MÜLLER GE, PILZECKER A. 1900. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Z Psychol Ergänzungsband*. 1: 1–300.

NADER K. 2003. Memory traces unbound. *Trends Neuroscience*. 26: 65–72.

- NADER K, SCHAPE GE, LEDOUX JE. 2000a. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. 406: 722–726.
- NADER K, SCHAPE GE, LEDOUX JE. 2000b. The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosc*. 1: 216-9.
- NAKAYAMA D, HASHIKAWA-YAMASAKI Y, IKEGAYA Y, MATSUKI N, NOMURA H. 2016. Late Arc/Arg3.1 expression in the basolateral amygdala is essential for persistence of newly-acquired and reactivated contextual fear memories. *Scientific Reports*. 6: 21007.
- O'DONNELL T, HEGADOREN KM, COUPLAND NC. 2004. Noradrenergic mechanisms in the pathophysiology of post-traumatic stress disorder. *Neuropsychobiology*. 50.4: 273-283.
- PAVLOV IP. 1927. *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. London: Oxford Univ. Press.
- PAXINOS G, WATSON C, CARRIVE P, KIRKCALDIE MTK, ASHWELL K. 2009. *Chemoarchitectonic atlas of the rat brain*.
- PEDRAZA LK, SIERRA RO, BOOS FZ, HAUBRICH J, QUILLFELDT JA, DE OLIVEIRA ALVARES L. 2016. The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus*. 26(3): 362-71.
- PEDREIRA ME, MALDONADO H. 2003. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*. 38: 863–869.

- PEREIRA DE VASCONCELOS A, CASSEL JC. 2015. The nonspecific thalamus: a place in a wedding bed for making memories last? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 54: 175-96.
- PERI T, BEN-SHAKHAR G, ORR SP, SHALEV AY. 2000. Psychophysiological assessment of aversive conditioning in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry.* 47(6): 512–519.
- PERUSINI JN, MEYER EM, LONG VA, RAU V, NOCERA N, AVERSHAL J, FANSELOW MS. 2016. Induction and expression of fear sensitization caused by acute traumatic stress. *Neuropsychopharmacology.* 41(1): 45-57.
- PILE V, BARNHOFER T, WILD J. 2015. Updating versus Exposure to Prevent Consolidation of Conditioned Fear. *PLoS one.* 10(4): e0122971.
- PITKANEN A, PIKKARAINEN M, NURMINEN N, YLINEN A. 2000. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci.* 911: 369–391.
- PITMAN, RK. 1989. Post-traumatic stress disorder, hormones, and memory. *Biol. Psychiatry.* doi:10.1016/0006-3223(89)90033-4
- PITMAN RK, DELAHANTY DL. 2005. Conceptually driven pharmacologic approaches to acute trauma. *CNS Spectr.* 2: 99–106.
- PITMAN RK, RASMUSSEN AM, KOENEN KC, SHIN LM, ORR SP, GILBERTSON MW. 2012. Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nat Rev Neurosci.* 13: 769-787.
- POTHUIZEN HH, ZHANG WN, JONGEN-RELO AL, FELDON J, YEE BK. 2004. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-

subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur. J. Neurosci.* 19: 705–712.

POWER AE, BERLAU DJ, MCGAUGH JL, STEWARD O. 2006. Anisomycin infused into the hippocampus fails to block “reconsolidation” but impairs extinction: the role of re-exposure duration. *Learning & Memory.* 13(1): 27–34.

PRASAD JA, MACGREGOR EM, CHUDASAMA Y. 2013. Lesions of the thalamic reuniens cause impulsive but no compulsive responses. *Brain Struct. Funct.* 218 (1): 85-96.

PRZYBYSLAWSKI J, SARA SJ. 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Beh Brain Res.* 84: 241-6.

QUIRK GJ, PARÉ D, RICHARDSON R, HERRY C, MONFILS MH, SCHILLER D, VICENTIC A. 2010. Erasing fear memories with extinction training. *J Neurosci.* 30: 14993-14997.

RANGANATH C, HELLER A, COHEN MX, BROZINSKY CJ, RISSMAN J. 2005. Functional connectivity with the hippocampus during successful memory formation. *Hippocampus.* 15(8): 997-1005.

RASHID AJ, YAN C, MERCALDO V, HSIANG HL, PARK S, COLE CJ, DE CRISTOFARO A, YU J, RAMAKRISHNAN C, LEE SY, DEISSEROTH K. 2016. Competition between engrams influences fear memory formation and recall. *Science.* 353(6297): 383-7.

RESCORLA RA, HETH CD. 1975. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* 1: 88–96.

ROSEN JB, SCHULKIN J. 1998. From normal fear to pathological anxiety. *Psychological review.* 105(2): 325.

- ROZESKE RR, VALERIO S, CHAUDUN F, HERRY, C. 2014. Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. *Genes, Brain and Behavior*. 14(1): 22–36.
- RUDY JW, MATUS-AMAT P. 2005. The ventral hippocampus supports a memory representation of context and contextual fear conditioning: implications for a unitary function of the hippocampus. *Behav. Neurosci*. 119: 154–163.
- RUEDIGER S, VITTORI C, BEDNAREK E, GENOUD C, STRATA P, SACCHETTI B, CARONI P. 2011. Learning-related feedforward inhibitory connectivity growth required for memory precision. *Nature*. 473(7348): 514-8.
- SACHSER RM, HAUBRICH J, LUNARDI PS, DE OLIVEIRA ALVARES L. 2016. Forgetting of what was once learned: Exploring the role of postsynaptic ionotropic glutamate receptors on memory formation, maintenance, and decay. *Neuropharmacology*. 112: 94-103.
- SARA SJ. 2000a. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn. Mem.* 7: 73–84.
- SARA SJ. 2000b. Strengthening the shaky trace through retrieval. *Nat. Rev. Neurosci.* 1: 212–213
- SCHACTER DL. 2012. Forgotten ideas, neglected pioneers: Richard Semon and the story of memory. *Psychology Press*.
- SEMON R. 1904. Die Mneme als erhaltendes Prinzip im Wechsel des organischen Geschehens, Engelmann. Leipzig, Germany.
- SEVENSTER D, BECKERS T, KINDT M. 2012. Retrieval per se is not sufficient to trigger reconsolidation of human fear memory. *Neurobiology of learning and memory*. 97(3): 338-45.

- SHEPARD RN. 1987. Toward a universal law of generalization for psychological science. *Science*. 237: 1317–1323.
- SIAPAS AG, LUBENOV EV, WILSON MA. 2005. Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. *Neuron*. 46(1): 141-51.
- SOETER M, KINDT M. 2013. High trait anxiety: a challenge for disrupting fear memory reconsolidation. *PLoS One*. 8(11): e75239.
- SQUIRE LR, ALVAREZ P. 1995. Retrograde amnesia and memory consolidation: A neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol*. 5: 169–177.
- SQUIRE LR, GENZEL L, WIXTED JT, MORRIS RG. 2015. "Memory consolidation." *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 7a021766.
- STERN CA, GAZARINI L, VANVOSSSEN AC, HAMES MS, BERTOGLIO LJ. 2014. Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. *Learn Mem*. 21: 14-20.
- STRUYF D, ZAMAN J, VERVLIIET B, VAN DIEST I. 2015. Perceptual discrimination in fear generalization: Mechanistic and clinical implications. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 59: 201-207.
- SUZUKI A, JOSSELYN SA, FRANKLAND PW, MASUSHIGE S, SILVA AJ, KIDA S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *Journal of Neuroscience*. 24: 4787–4795.
- SWANSON, LW, COWAN WM. 1977. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol*. 172: 49–84.

- TAKEHARA-NISHIUCHI K, MCNAUGHTON BL. 2008. Spontaneous changes of neocortical code for associative memory during consolidation. *Science*. 322(5903): 960-3.
- THIELEN JW, TAKASHIMA A, RUTTERS F, TENDOLKAR I, FERNÁNDEZ G. 2016. Transient relay function of midline thalamic nuclei during long-term memory consolidation in humans. *Learning & Memory*. 22(10): 527-31.
- TSE D, LANGSTON RF, KAKEYAMA M, BETHUS I, SPOONER PA, WOOD ER, WITTER MP, MORRIS RG. 2007. Schemas and memory consolidation. *Science*. 316: 76–82.
- VAN KESTEREN MT, RIJPKEMA M, RUITER DJ, FERNÁNDEZ G. 2010. Retrieval of associative information congruent with prior knowledge is related to increased medial prefrontal activity and connectivity. *The Journal of Neuroscience*. 30(47): 15888-94.
- VAN KESTEREN MT, RUITER DJ, FERNANDEZ G, HENSON RN. 2012. How schema and novelty augment memory formation. *Trends Neurosci*. 35: 211–219.
- VANVOSSSEN AC, PORTES MA, SCOZ-SILVA R, REICHMANN HB, STERN CA, BERTOGLIO LJ. 2017. Newly acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prelimbic cortex NMDA receptors. *Neurobiol Learn Mem*. 137: 154-162.
- VARELA C, KUMAR S, YANG JY, WILSON MA. 2014. Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens. *Brain Struct. Funct*. 219: 911–929.

VERTES, RP. 2002. Analysis of the projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on reuniens nucleus. *J. Comp. Neurol.* 442: 163–187.

VERTES RP. 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse.* 51: 32-58.

VERTES RP. 2006. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience.* 142: 1–20.

VERTES RP. 2015. Major diencephalic inputs to the hippocampus: supramammillary nucleus and nucleus reuniens. Circuitry and function. *Progress in Brain Research.* 219: 121-144.

VERTES RP, HOOVER WB, SZIGETI K, LERANTH C. 2007. Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Res. Bull.* 71: 601–609.

VERTES RP, LINLEY SB, HOOVER WB. 2015. Limbic circuitry of the midline thalamus. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 54: 89–107.

VERVLIET B, CRASKE MG, HERMANS D. 2013. Fear Extinction and Relapse: State of the Art. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 9: 215–248.

WANG H, HU Y, TSIEN JZ. 2006. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Progress in neurobiology.* 79(3): 123-135.

WANG SH, DE OLIVEIRA ALVARES L, NADER K. 2009. Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nat Neurosci.* 12: 905–912.

- WILTGEN BJ, SILVA AJ. 2007. Memory for context becomes less specific with time. *Learning & Memory*. 14: 313–317.
- WILTGEN BJ, ZHOU M, CAI Y, BALAJI J, KARLSSON MG, PARIVASH SN. 2010. The hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. *Current Biology*. 1–9: 819.
- WINOCUR G, FRANKLAND PW, SEKERES M, FOGEL S, MOSCOVITCH M. 2009. Changes in context-specificity during memory reconsolidation: Selective effects of hippocampal lesions. *Learning & Memory*. 16: 722–729.
- WINOCUR G, MOSCOVITCH M, SEKERES M. 2007. Memory consolidation or transformation: Context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nature Neuroscience*. 10: 555–557.
- WINTERS BD, TUCCI MC, DACOSTA-FURTADO M. 2009. Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information. *Learn Mem*. 16: 545–553.
- WOOD NE, ROSASCO ML, SURIS AM, SPRING JD, MARIN MF, LASKO NB, PITMAN RK. 2015. Pharmacological blockade of memory reconsolidation in posttraumatic stress disorder: three negative psychophysiological studies. *Psychiatry research*. 225(1): 31-39.
- WINOCUR G, MOSCOVITCH M, SEKERES M. 2007. Memory consolidation or transformation: Context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nature Neuroscience*. 10: 555–557.

WOOD KH, VER HOEF LW, KNIGHT DC. 2012. Neural mechanisms underlying the conditioned diminution of the unconditioned fear response. *Neuroimage*. 60: 787–799.

WOUTERLOOD FG, SALDANA E, WITTER MP. 1990. Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol*. 296: 179–203.

XU C, KRABBE S, GRÜNDEMANN J, BOTTA P, FADOK JP, OSAKADA F, SAUR D, GREWE BF, SCHNITZER MJ, CALLAWAY EM, LÜTHI A. 2016. Distinct Hippocampal Pathways Mediate Dissociable Roles of Context in Memory Retrieval. *Cell*. 167(4): 961-72.

XU W, SÜDHOF TC. 2013. A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science*. 339: 1290-1295

YUAN RK, HEBERT JC, THOMAS AS, WANN EG, MUZZIO IA. 2015. HDAC I inhibition in the dorsal and ventral hippocampus differentially modulates predator-odor fear learning and generalization. *Frontiers in neuroscience*. 9.

ZELIKOWSKY M, HERSMAN S, CHAWLA MK, BARNES CA, FANSELOW MS. Neuronal ensembles in amygdala, hippocampus, and prefrontal cortex track differential components of contextual fear. 2014. *Journal of Neuroscience*. 34(25): 8462-6.

ZHANG WN, BAST T, FELDON J. 2001. The ventral hippocampus and fear conditioning in rats: different anterograde amnesias of fear after infusion of N-methyl-D-aspartate or its noncompetitive antagonist MK-801 into the ventral hippocampus. *Behav. Brain Res*. 126: 159–174.