

JAQUELINE MAISA FRANZEN

EFEITO DO MIDAZOLAM SOBRE A RECONSOLIDAÇÃO E A  
EXTINÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL EM  
RATAS

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

Florianópolis, 2018

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

FRANZEN, JAQUELINE MAISA  
EFEITO DO MIDAZOLAM SOBRE A RECONSOLIDAÇÃO E A  
EXTINÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL EM RATAS /  
JAQUELINE MAISA FRANZEN; orientador, LEANDRO JOSÉ  
BERTOGLIO, coorientador, MARCELO GIACHERO, 2018.  
124 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

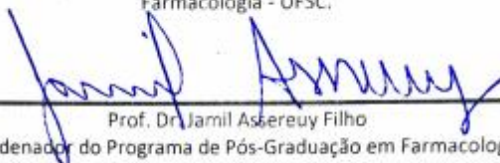
1. Farmacologia. 2. Memória aversiva contextual.  
3. Reconsolidação e Extinção. 4. Limbo. 5. Fêmeas. I.  
BERTOGLIO, LEANDRO JOSÉ. II. GIACHERO, MARCELO. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

**“Efeito do midazolam sobre a reconsolidação e a extinção da memória aversiva contextual em ratas”**

Por

**Jaqueline Maisa Franzen**

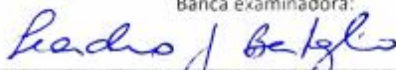
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (29/PPGFMC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



---

Prof. Dr. Jamil Asbereuy Filho  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:




---

Dr. Leandro José Bertogno (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador



---

Dr. Lucas de Oliveira Alvares (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)



---

Dr. Geison Izidio (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr. Rafael Mariano de Bitencourt (Universidade do Sul de Santa Catarina)

Florianópolis, 21 de Fevereiro de 2018.



**Dedico este trabalho**

À minha família, meu bem  
mais precioso.

A todos aqueles que  
acreditam na beleza dos  
seus sonhos.



## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Leandro José Bertoglio, por me acolher em seu laboratório e pela orientação ao longo desta jornada. Muito obrigada pela oportunidade desafiadora de executar este trabalho e por me incentivar na busca do aperfeiçoamento.

Ao Dr. Marcelo Giachero, por sempre exigir o meu máximo experimental e intelectualmente desde o primeiro momento. Obrigada pela paciência e pelas intermináveis horas de discussão que contribuíram de maneira grandiosa para o meu crescimento acadêmico, científico e pessoal.

Agradeço imensamente ao professor Dr. Carlos Rogério Tonussi e a equipe LANEN por ceder a sua estrutura de biotério para estadia das ratas que viabilizaram a execução deste trabalho.

Agradeço ao nosso “GT3” Grupo de Trabalho 3 da Farmacologia, Dr. José Eduardo da Silva e Dr. Carlos Rogério Tonussi e principalmente ao Dr. Antônio de Pádua Carobrez por contribuírem para o meu amadurecimento filosófico e acadêmico.

Aos professores, Dr. Geison Izídio, Dr. Lucas de Oliveira Alvares, Dr. Rafael Mariano de Bitencourt e Dr. Antônio de Pádua Carobrez por aceitarem avaliar e colaborar no aprimoramento desse trabalho.

Os demais professores do Departamento de Farmacologia.

Aos meus colegas de Laboratório, Rafael, Fernanda, Hugo e Bárbara pela companhia diária e ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, pela dedicação e ao CNPq pelo suporte financeiro.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço aos meus pais Marisa e Auri e aos meus irmãos Aline e River, pelo apoio, amor incondicional e por perdoarem a minha ausência ao longo desta caminhada (que perdura por cerca de 8 anos).

À minha irmã, Aline, que sempre me manteve motivada e firme nos diversos âmbitos da minha vida, mesmo estando tão distante.

Às minhas primeiras incentivadoras da carreira científica e amigas Vilminha e Talize, que exercem seu papel de educadoras e pesquisadoras muito além das paredes da universidade.

Ao meu grande amigo, incentivador e eterno orientador da graduação Dr. Rafael Mariano Bitencourt, sua amizade, apoio e palavras foram cruciais durante toda a minha jornada científica, és um exemplo!

Ao Nakamura, que com seu amor e paciência, apoiou, acompanhou e vivenciou cada momento comigo. Obrigada por ter me ajudado a ficar nos trilhos do “Fitness” e não ter me deixado cair no sedentarismo.

À Narinha, minha “*The Best Roommate*”. Dividimos muito mais do que despesas, dividimos sonhos, ideias, risadas, RU’s e claro, o melhor tereré no fim da tarde! Estendo o agradecimento à sua família, que carinhosamente me acolheu. Obrigada por tudo e principalmente pela paciência ao ouvir todos os dias as minhas “novidades experimentais”. Com certeza consegue apresentar este trabalho sem qualquer dificuldade.

À Ana Idalina, Ruy Acenso e ao Felipe Vanz, amigos que o departamento me deu. Obrigada por todo o apoio, conversas, sugestões, risadas e idas ao RU. A amizade de vocês é sensacional.

Aos meus amigos de longa data, Jéssica e Henrique, que mesmo a muitos quilômetros de mim, sempre me receberam com sorrisos e abraços calorosos.

Por fim, agradeço ao universo por garantir que cada coisa se encaixe perfeitamente, em seu tempo...



*“We are what we repeatedly do. Excellence, then, is not an act, but a habit.”*

— **Aristotle**



## RESUMO

Fêmeas apresentam particularidades no desempenho de tarefas hipocampo-dependentes, como é o caso da memória aversiva contextual. A memória reativada pode seguir destinos diferentes. A duração da sessão de reativação desempenha um papel importante na modulação da expressão da resposta defensiva no paradigma de medo condicionado. Entretanto, a caracterização do curso temporal da memória aversiva contextual após a re-exposição ao contexto pareado só foi demonstrada em machos. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar a reconsolidação e a extinção da memória aversiva contextual recente, após diferentes tempos de re-exposição seguida da administração sistêmica do modulador alostérico positivo GABA-A, midazolam (MDZ 3 mg/Kg i.p.). Utilizando paradigma de medo contextual, fêmeas Wistar (~100 dias) foram treinadas e, no dia seguinte, randomizadas de acordo com a fase do ciclo estral antes de uma sessão de re-exposição de 2 min. Não foi observada a relação entre a fase do ciclo estral e a expressão da resposta defensiva condicionada, permitindo a realização dos demais experimentos independentemente da fase do ciclo estral. Posteriormente, ratas treinadas foram expostas a diferentes tempos de sessão de re-exposição (1, 2, 5, 7, 10 ou 30 min), submetidas a sessões de teste e, finalmente, a uma sessão de reinstalação. Os resultados obtidos demonstram que 2 e 5, mas não 1 min, de re-exposição são capazes de promover a desestabilização da memória, evidenciado pelo efeito amnésico do MDZ nos testes posteriores. Em contraste, quando administrado após re-exposições de 7 ou 10 min, o MDZ não exerceu efeito sobre a expressão do congelamento nos testes subsequentes, incluindo a reinstalação da memória. Finalmente, o MDZ administrado após a re-exposição de 30 min prejudicou a retenção da extinção. Avaliados em conjunto, os resultados obtidos indicam que o MDZ é capaz de prejudicar a reconsolidação e a consolidação da extinção da memória aversiva contextual em fêmeas. No entanto, um período insensível ao efeito amnésico do MDZ ocorre após sessões de re-exposição intermediárias, sugerindo uma dissociação entre a vulnerabilidade a agentes amnésicos e a expressão da resposta defensiva.

**Palavras-chave:** memória aversiva contextual, reconsolidação, extinção, limbo, midazolam, fêmeas.



## ABSTRACT

Females present particularities in the performance of hippocampal-dependent tasks, such as contextual aversive memory. The reactivated memory may follow different destinies. The duration of the reactivation session plays an important role in modulating the expression of the defensive response in the fear conditioning. However, the characterization of the temporal course of contextual aversive memory after re-exposure to the paired context has only been demonstrated in males. Thus, the aim of this study was to investigate the reconsolidation and extinction of recent contextual aversive memory after different re-exposure times followed by systemic administration of GABA-A positive allosteric modulator midazolam (MDZ 3 mg / kg i.p.). Using contextual fear paradigm, Wistar females (~ 100 days) were trained and, on the following day, randomized according to the estrus cycle phase before 2 min re-exposure session. It was not observed the relationship between the estrus cycle phase and the expression of the conditioned defensive response, allowing, the other experiments to be performed independently of the estrous cycle phase. After, trained rats were exposed to different reexposure session times (1, 2, 5, 7, 10 or 30 min), submitted to test sessions and finally to a reinstatement session. The results obtained demonstrate that 2 and 5, but not 1 min, of re-exposure are capable of promote memory destabilization, evidenced by the amnesic effect of MDZ in subsequent tests. In contrast, when given after re-exposures of 7 or 10 min, MDZ had no effect on the expression of freezing in subsequent tests, including reinstatement of memory. Finally, the MDZ administered after the 30 min re-exposure impaired the retention of extinction. Altogether, the results indicate that the MDZ is capable of exerting an interfering effect on the reconsolidation and the consolidation of the extinction of contextual aversive memory in females. In conclusion, a period insensitive to the amnesic effect of MDZ occurs after briefly reexposure sessions, suggesting a dissociation between vulnerability to amnesic agents and the expression of the defensive response.

**Key words:** fear memory, reconsolidation, extinction, limbo state, midazolam, females.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Paradigma do condicionamento aversivo ao contexto	26
Figura 2 – Representação gráfica do processo de aquisição e consolidação da memória .....	28
Figura 3 – Representação da evocação da memória proposta por Lewis em 1979 .....	30
Figura 4 – Representação da labilização e restabilização do traço de memória .....	31
Figura 5 – Representação esquemática da modulação do traço de memória.....	35
Figura 6 – Estratégias para extinção da memória aversiva contextual.....	39
Figura 7 – Modelos de transição da reconsolidação para a extinção ..	42
Figura 8 –Representação esquemática do receptor GABAérgico do tipo A e a ação do MDZ .....	47
Figura 9 – Ilustração dos ambientes utilizados neste estudo .....	51
Figura 10 – protocolo básico do paradigma de condicionamento de medo contextual utilizado neste estudo .....	52
Figura 11 – Evidência de que a fase do ciclo estral não influencia na expressão da memória de medo contextual (experimento 1) .....	61
Figura 12 – MDZ não prejudica a reconsolidação da memória de medo contextual seguido de uma re-exposição de 1 minuto (experimento 2).....	62
Figura 13 – MDZ previne a reinstalação da memória aversiva após uma sessão de re-exposição de 2 minutos (experimento 3).....	63

Figura 14 – MDZ previne a reinstalação da memória aversiva após uma sessão de re-exposição de 5 minutos (experimento 4) ...	65
Figura 15 – MDZ depois de uma sessão de re-exposição de 7 minutos não exerce efeito sobre a expressão de congelamento (experimento 5) .....	66
Figura 16 – MDZ depois de uma sessão de re-exposição de 10 minutos não exerce efeito sobre a expressão de congelamento (experimento 6) .....	68
Figura 17 – MDZ prejudica a consolidação da memória de extinção após uma sessão de re-exposição de 30 minutos (experimento 7) .....	69
Figura 18 – MDZ após a sessão de Teste A1 não exerce efeito sobre a expressão da memória aversiva contextual (experimento 8) .....	71
Figura 19 – Efeito do MDZ após uma re-exposição de 5 minutos ao Contexto pareado é restrito a janela temporal de 6 horas (experimento 9) .....	72
Figura 20 – Efeito do MDZ é específico para memórias evocadas (experimento 10) .....	73
Figura 21 – Conclusão gráfica .....	85
Figura suplementar 1 – A intensidade do treino no dia do condicionamento influencia na expressão do congelamento no contexto pareado e não pareado (experimento suplementar 1) .....	116
Figura suplementar 2 – Efeito das re-exposições sucessivas ao Contexto pareado sobre os níveis de congelamento 1 ou 9 dias depois do condicionamento .....	119



Figura suplementar 3 – Administração do EI no Contexto C per se não é suficiente para aumentar a expressão de congelamento no Contexto A (experimento suplementar 3) .....	121
Figura suplementar 4 – Efeito da fase do ciclo estral sobre a aquisição, consolidação e reinstalação da memória de medo contextual (experimento suplementar 4) .....	122
Figura suplementar 5 – Representação gráfica do curso temporal das sessões de re-exposição de 5, 7, 10 e 30 min .....	123
Figura suplementar 6 – Sessão de re-exposição de 2 min não é suficiente para induzir a labilização da memória em machos .....	124



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABL</b>	Amídala basolateral
<b>AMPA</b>	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
<b>AMPC</b>	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>Arc</b>	Proteína associada ao citoesqueleto regulada por ativação, do inglês "Activity Regulated Cytoskeletal Protein"
<b>ASO</b>	Anisomicina, inibidor de síntese proteica
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês "Brain-derived Neurotrophic Fator"
<b>BLA</b>	Amídala basolateral
<b>CAMK</b>	cinase dependente de cálcio/calmodulina, do inglês "Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase"
<b>CaN</b>	Calcineurina
<b>CB1</b>	Receptores canabinoides do tipo CB1
<b>CBD</b>	Canabidiol, agonista indireto de receptores canabinoides
<b>CREB</b>	Proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc, do inglês "cAMP response element-binding protein"
<b>CeA</b>	Amígdala Central
<b>DCS</b>	D-cicloserina, agonista parcial do receptor NMDA
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GABA-A</b>	Receptor GABAérgico do tipo A
<b>EI</b>	Estímulo incondicionado
<b>EC</b>	Estímulo condicionado
<b>EN</b>	Estímulo neutro
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>ER</b>	Receptor para estrógenos
<b>ERK</b>	Do inglês "Extracellular Signal-regulated Kinase"
<b>E2</b>	Estradiol, hormônio gonadal da classe dos estrógenos
<b>GluA2</b>	Subunidade de receptor AMPA
<b>GluN2B</b>	Subunidade de receptor NMDA
<b>HPC</b>	Hipocampo
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IFEN</b>	Ifenprodil, antagonista seletivo para receptores NMDA NR2B
<b>IOI</b>	Ioimbina, antagonista de receptores $\alpha 2$ adrenérgicos
<b>ITC</b>	Células intercaladas da amígdala, grupos de neurônios GABAérgicos entre a amígdala basolateral e central
<b>Kg</b>	Quilograma

<b>LTP</b>	Potenciação de longa duração, do inglês “Long-Term Potentiation”
<b>LTD</b>	Depressão de longa duração, do inglês “Long-Term Depression”
<b>mA</b>	Miliampère
<b>MAPK</b>	Do inglês “Mitogen-Activated Protein Kinase”
<b>MDZ</b>	Midazolam, modulador alostérico positivo GABA-A
<b>Mg</b>	Miligramas
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-cinase, do inglês, “Phosphoinositide 3-kinase”
<b>PKA</b>	Proteína cinase A, do inglês “Protein Kinase A”
<b>TEPT</b>	Transtorno do estresse pós-traumático
<b>VEI</b>	Veículo
<b>Zif268</b>	Do inglês, “Zinc Finger Protein”, gene de expressão imediata

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	25
1.1 O CÉREBRO EMOCIONAL: UM OLHAR PARA A MEMÓRIA AVERSIVA.....	25
1.2 O CONDICIONAMENTO CLÁSSICO COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DA MEMÓRIA EMOCIONAL.....	26
1.4 FASES DO PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA.....	27
1.5 CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA .....	27
1.6 EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA.....	29
1.7 RECONSOLIDAÇÃO .....	30
1.8 EXTINÇÃO DA MEMÓRIA .....	35
1.9 RECONSOLIDAÇÃO versus EXTINÇÃO.....	38
1.10 MEMÓRIAS AVERSIVAS E FÊMEAS.....	41
1.11 MIDAZOLAM COMO FERRAMENTA FARMACOLÓGICA PARA O ESTUDO DA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL....	45
2 HIPÓTESE.....	47
3 OBJETIVOS .....	47
3.1 OBJETIVO GERAL .....	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	48
4.1 ANIMAIS.....	48
4.2 DROGAS .....	48
4.3 CONDICIONAMENTO DE MEDO CONTEXTUAL.....	49
4.3.1 Aparatos experimentais:.....	49
4.3.2 Protocolos:.....	50
4.3.3 Intervenções farmacológicas: .....	52
4.3.4 Considerações procedimentais gerais:.....	52
4.4 VERIFICAÇÃO DO CICLO ESTRAL .....	52
4.4.1 Considerações relacionadas ao ciclo estral: .....	53
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	54

5 EXPERIMENTOS .....	55
5.1 Experimento 1: Efeito da fase do ciclo estral sobre a expressão da memória de medo contextual durante a exposição aos contextos pareado e não pareado. ....	55
5.2 Estudo da duração da sessão de re-exposição como indicadora do desenvolvimento final da memória. ....	55
5.2.1 Experimento 2: Efeito da administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 1 min sobre a memória aversiva contextual .....	55
5.3 Experimento 3: Efeito da administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 2 min sobre a memória aversiva contextual .....	56
5.4 Experimento 4: Efeito da administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 5 min sobre a memória aversiva contextual .....	56
5.5 Experimento 5: Efeito da administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 7 min sobre a memória aversiva contextual .....	56
5.6 Experimento 6: Efeito da administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 10 min sobre a memória aversiva contextual .....	56
5.7 Experimento 7: Efeito da administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 30 min s sobre a memória aversiva contextual .....	57
5.8 Experimento 8: Efeito da administração de MDZ após a sessão de Teste A1 sobre a expressão da memória aversiva contextual .....	57
5.9 Experimento 9: Efeito da administração de MDZ sobre a expressão da memória aversiva contextual 6 horas após a sessão de re-exposição. ....	57
5.10 Experimento 10: Efeito da administração de MDZ na ausência de uma sessão de evocação sobre a expressão da memória aversiva contextual.....	58
6 RESULTADOS.....	59
6.1 Experimento 1: A fase do ciclo estral verificada no dia da sessão de evocação não influencia na expressão da memória aversiva contextual. ....	59
6.2 Experimento 2: Administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 1 min não exerce efeito sobre a expressão da memória aversiva contextual.....	61

6.3 Experimento 3: MDZ administrado após uma sessão de re-exposição de 2 min previne a reinstalação da memória aversiva contextual. ....	62
6.4 Experimento 4: MDZ administrado após uma sessão de re-exposição de 5 min previne a reinstalação da memória aversiva contextual. ....	63
6.5 Experimento 5: Administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 7 min não exerce efeito sobre expressão da memória aversiva contextual.....	64
6.6 Experimento 6: Administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 10 min não exerce efeito a sobre a expressão da memória aversiva contextual.....	65
6.7 Experimento 7: Administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 30 min prejudica a retenção da extinção da memória aversiva contextual.....	67
6.8 Experimento 8: Efeito da administração de MDZ após a sessão de Teste A1 sobre a expressão da memória aversiva contextual .....	69
6.9 Experimento 9: Efeito do MDZ é restrito à janela temporal de 6h após a evocação da memória. ....	70
6.10 Experimento 10: Efeito do MDZ é específico para memórias evocadas. ....	71
7 DISCUSSÃO.....	73
7.1 FÊMEAS E MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL: MEMÓRIA ALÉM DO CICLO ESTRAL.....	73
7.2 A DURAÇÃO DA EVOCÇÃO COMO FATOR DETERMINANTE NA DESESTABILIZAÇÃO DA MEMÓRIA. ....	74
7.3 ENTRE A RECONSOLIDAÇÃO E A EXTINÇÃO: UMA TÊNUE LINHA TEMPORAL? .....	79
7.4 LONGA SESSÃO OU POR REPETIÇÃO: O CASO DA EXTINÇÃO CONTEXTUAL EM FÊMEAS .....	82
8 CONCLUSÕES.....	84
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	85
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	86
APÊNDICE - RESULTADOS SUPLEMENTARES .....	112
Experimento suplementar 1: Efeito da intensidade do treino sobre a expressão do congelamento no contexto pareado e não pareado .....	113

Experimento suplementar 2: Efeito das re-exposições sucessivas ao Contexto pareado sobre os níveis de congelamento 1 ou 9 dias depois do condicionamento .....	116
Experimento suplementar 3: Efeito da intensidade do choque no Contexto C sobre a expressão de congelamento no Contexto .....	118
Experimento suplementar 4: Efeito da fase do ciclo estral sobre a expressão da memória de medo contextual durante a exposição de tempo intermediário ao contextos pareado .....	119
Figura suplementar 5: Curso temporal da expressão de congelamento no contexto pareado durante as sessões de 5, 7, 10 e 30 min .....	121
Figura suplementar 6: Sessão de re-exposição de 2 min não é suficiente para induzir a labilização em machos .....	123



## INTRODUÇÃO

---

### 1.1 O CÉREBRO EMOCIONAL: UM OLHAR PARA A MEMÓRIA AVERSIVA

Diariamente e ao longo de suas vidas, os animais são confrontados com um número elevado de informações e situações do meio externo. O encéfalo tem a função de processar, filtrar, armazenar e coordenar esse volume de informações. Especificamente, as experiências prévias vivenciadas pelo organismo são codificadas no âmbito neuronal na forma de representações internas. A retenção dessas representações é o que se conhece como memória (DUDAI 1989; DUDAI, 2002).

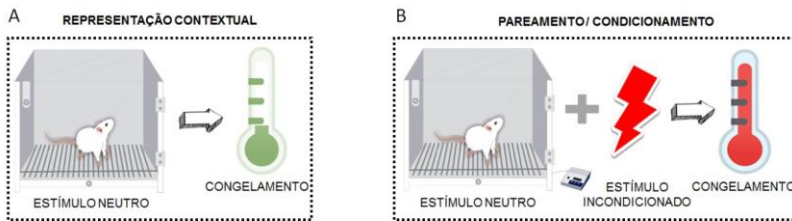
Por que não conseguimos lembrar todos os eventos com a mesma riqueza de detalhes? A resposta pode parecer simples: existem diversos tipos de memória. Entretanto, no ambiente cerebral, os mecanismos envolvidos são muito mais complexos. O componente emocional presente no momento do aprendizado influencia diretamente na sua codificação, e coordena a relevância e persistência da informação adquirida (MCGAUCH, 2013; ETKIN, BÜCHEL e GROSS, 2015). Essas características provêm do envolvimento de regiões como a amígdala e o córtex pre-frontal (CPF), onde neurotransmissores e hormônios relacionados ao estresse, como a adrenalina e o cortisol, são liberados gradualmente e facilitam a formação de memórias emocionais, tanto negativas quanto positivas (LABAR e CABEZA, 2006). No caso da valência negativa, a memória aversiva é um bom exemplo (PLOSKI e MCINTYRE, 2015a).

Do ponto de vista adaptativo, a memória aversiva apresenta o papel fisiológico de conduzir a escolha da melhor estratégia para manutenção da integridade do organismo. Entretanto, em determinadas situações, memórias excessivamente aversivas podem se tornar não adaptativas ou disfuncionais, resultando em uma distorção da percepção de perigo (YEHUDA et al., 2010; PERUSINI e FANSELOW, 2015). Em humanos, esta parece ser a base para o desenvolvimento de transtornos associados às memórias traumáticas como o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) (KILPATRICK et al., 2013) e ansiedade generalizada (GROSS e HEN, 2004; JASNOW et al., 2017). A melhor compreensão das bases neurobiológicas do processamento da memória emocional poderia fornecer ferramentas adequadas para a prevenção e tratamento

desses transtornos (LIBERZON e SRIPADA, 2007; RAMIKIE e RESSLER, 2017).

## 1.2 O CONDICIONAMENTO CLÁSSICO COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DA MEMÓRIA EMOCIONAL

O crescente interesse na compreensão das bases neurobiológicas que suportam as memórias emocionais impulsiona a investigação do processamento deste tipo de memória em modelos laboratoriais não-clínicos. Um dos paradigmas comumente utilizado para o estudo da memória aversiva é o condicionamento Pavloviano de medo (PAVLOV, 1927). Este paradigma consiste na associação ou pareamento de dois estímulos: um estímulo biologicamente relevante (estímulo incondicionado, EI) (ex., choque elétrico) e um estímulo emocionalmente neutro (EN), como um contexto ou tom. O EI por si só é capaz de induzir uma resposta defensiva incondicionada enquanto que o EN não. Uma vez associados, o EN passa agora a ser um estímulo condicionado (EC), e com a capacidade de desencadear uma resposta defensiva condicionada (RC), como representado graficamente na figura 1. A RC é evidenciada pela alteração de parâmetros fisiológicos como o aumento da pressão arterial, parâmetros imunes, hormônios relacionados ao estresse e/ou a expressão no nível comportamental de respostas defensivas (LEDOUX, 2000).



**Figura 1 – Paradigma do condicionamento aversivo ao contexto.** (A) A exposição ao estímulo neutro não é capaz de induzir alterações nas respostas defensivas. Contudo, a simples exposição a um novo contexto resulta na aquisição de uma representação contextual. (B) Esta representação contextual pode adquirir propriedades afetivas a partir da administração do estímulo incondicionado (representado pelo símbolo de choque elétrico). A partir desta associação, o estímulo neutro passa a ser associado à informação aversiva e este ambiente torna-se capaz de induzir a resposta condicionada. Adaptado de Maren, Panh e Liberzon (2013).

#### 1.4 FASES DO PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA

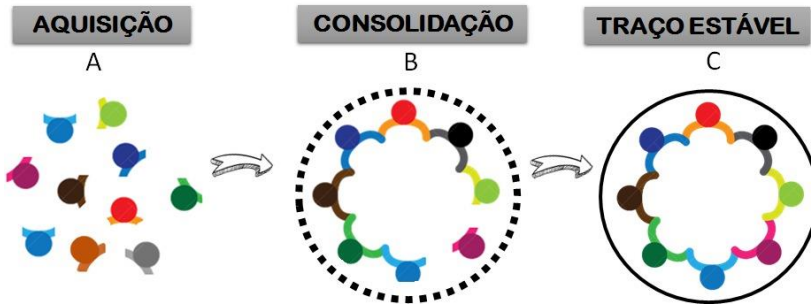
Atualmente, um amplo corpo de evidências tem demonstrado que após a aprendizagem, a informação recém-adquirida se encontra em uma conformação instável ou lábil, e gradualmente ao longo do tempo, é estabilizada mediante o processo chamado de consolidação. Uma vez estável, a memória pode ser novamente acessada através de pistas, ou estímulos que agem como lembretes, e desencadeiam a evocação. A evocação da memória pode induzir uma fase lábil adicional, precisando novamente ser estabilizada. Essa restabilização acontece mediante o processo chamado de reconsolidação. Além disso, a evocação da memória possibilita a modulação emocional atrelada ao aprendizado, processo este, denominado de extinção.

Desta forma, o processamento da memória provém de uma natureza dinâmica, composta por diversas fases: aquisição, consolidação, evocação, reconsolidação e/ou extinção. O estudo dos fenômenos que sustentam esses processos é crucial para a compreensão do processamento da memória.

#### 1.5 CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

A aquisição corresponde ao momento em que o organismo entra em contato pela primeira vez com uma determinada informação. Após a aquisição, a informação se encontra lábil, instável e maleável e é gradualmente estabilizada através do processo denominado de consolidação (Figura 2) (DAVIS e SQUIRE, 1984; GOELET et al., 1986; MCGAUGH, 2000).

A consolidação foi proposta pela primeira vez pelos pesquisadores Müller & Pilzecker em 1900. Através de um estudo conduzido em humanos, estes pesquisadores observaram que interferências aplicadas logo após, mas não depois de um longo período, afetavam o aprendizado inicial. Essa observação levou à sugestão de um “período temporal suscetível a interferência” após a aquisição, e que após esse período de consolidação, a memória se tornava estável e não mais sujeita a alterações (LECHNER et al, 1999).



**Figura 2 – Representação gráfica do processo de aquisição e consolidação da memória.** (A) A captação das informações do meio externo caracteriza a etapa de aquisição da memória, (B) Após a aquisição, a memória se encontra transitoriamente lábil e, durante um período temporal limitado, é gradualmente estabilizada através da consolidação. (C) A consolidação resulta na estabilização da memória e fornece a propriedade de estabilidade dos circuitos e vias que a compõe. As peças coloridas indicam as informações captadas durante a aquisição, o círculo pontilhado define o período instável e o círculo fechado ilustra a conformação estável do traço de memória.

Após um período de reclusa de quase 50 anos, a teoria da consolidação foi resgatada no ano de 1949. Dois trabalhos reviveram a temática e reforçaram os achados de Müller & Pilzecker, utilizando agora o choque eletroconvulsivo como tratamento amnésico (DUNCAN, 1949; GERARD, 1949). Trabalhos posteriores utilizaram outros tipos de intervenções com a finalidade de promover “amnésia”, como a inibição da síntese de proteínas (FLEXNER et al, 1965), e entre outros fatores amnésicos (GORDON e SPEAR, 1973). Vale ressaltar que, de maneira semelhante aos estudos pioneiros, as manipulações tornavam-se ineficazes quando executadas temporalmente distantes do aprendizado inicial.

Ainda no ano de 1949, Donald Hebb propôs um processo de reforço e de remodelamento sináptico, possivelmente envolvido com a retenção das memórias (HEBB, 1949; MILNER, SQUIRE e KANDEL, 1998; JOHANSEN et al., 2011). Hebb sugeriu que após um aprendizado, a sua retenção era sustentada pela estabilização do conjunto neuronal que fora requerido no momento da aprendizagem, fenômeno conhecido hoje como plasticidade associativa ou Hebbiana. Na década de 70, a teoria proposta por Hebb foi experimentalmente comprovada por Bliss e Lømo (1973) através da descoberta da potenciação de longa duração (LTP, do inglês, Long-Term Potentiation). Em um modelo animal, os

pesquisadores demonstraram que a estimulação de células específicas da via perforante gerava o aumento sustentado no potencial excitatório de neurônios pós-sinápticos e elevava a eficiência da transmissão sináptica (BLISS e COLLINGRIDGE, 1993).

Atualmente, o uso do termo consolidação remete tanto ao fenômeno temporal de estabilização do aprendizado quanto aos eventos moleculares e morfológicos pelos quais as sinapses são submetidas durante a estabilização (SQUIRE e ALVAREZ, 1995). Essas duas propostas de estabilização podem ser classificadas, e de certa forma simplificadas, adotando os termos consolidação sistêmica e consolidação sináptica.

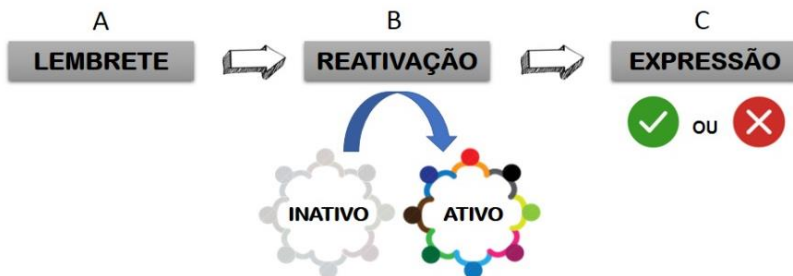
O modelo de consolidação sináptica engloba eventos de plasticidade sináptica que, de maneira sincronizada, associam, integram e estabilizam a rede neural recrutada no aprendizado (IZQUIERDO et al., 2006, 2016; FRANKLAND e BONTEMPI, 2005). Eventos celulares desencadeados via LTP e também pela depressão de longo prazo (LTD, do inglês Long-Term Depression) (LYNCH, 2004) fomentam as vias moleculares envolvidas na consolidação sináptica (ALBERINI e KANDEL, 2015; LEUNER e SHORS, 2004, 2003; SCHAFE et al., 2001; KANDEL, 2001) e re-estruturam, ou integram novas conexões sinápticas aos circuitos pré-existentes (DUDAI, 2004; LEDOUX, 2003). Já a consolidação sistêmica é voltada para processos de organização e/ou reorganização do armazenamento da memória no momento do aprendizado (KITAMURA et al., 2017), ou pela transferência ao longo do tempo (SQUIRE et al., 2015; MCCLELLAND, MCNAUGHTON, O'REILLY, 1995). Baseada em fatores temporais, a consolidação sistêmica postula a alteração no peso relativo das regiões cerebrais envolvidas na sustentação da memória (KITAMURA et al., 2017; SQUIRE e ALVAREZ, 1995).

Portanto, a consolidação da memória é resultado de uma soma de eventos celulares e moleculares ditada por condições temporais (CHEN et al. 2011; DUDAI, 2002), que resultam na alteração da rede neural, que suporta um aprendizado e medeia a estabilização da memória de curto para a de longo prazo (MCGAUGH, 2000; DUDAI, 2002; SCHAFE et al., 2001; ALBERINI, 2011).

## 1.6 EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA

A evocação da memória pode ser definida como o acesso a uma informação previamente adquirida e, do ponto de vista prático, pode ser

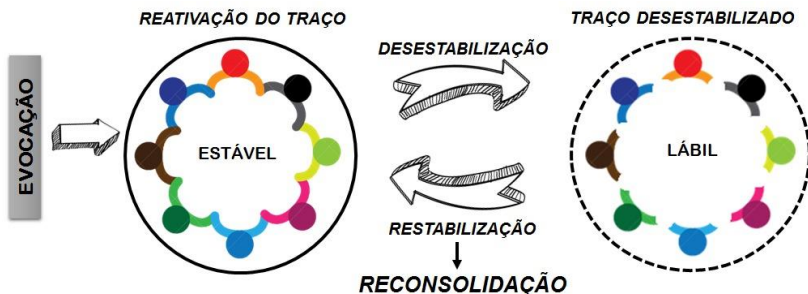
a única prova da existência de uma memória (JAMES, 1890). A evocação é composta por duas fases: reativação e expressão (Figura 3) (TULVING, 1983). No âmbito neurobiológico, a reativação é considerada como a etapa inicial da evocação e reflete a passagem do estado inativo para o estado ativo do conjunto neuronal que codifica uma memória. De maneira procedimental, a reativação pode ser induzida pela re-exposição às informações associadas no momento do aprendizado. Neste caso, o circuito neural que sustenta a memória, antes inativo passa para o estado ativo, o que pode, ou não, resultar na expressão comportamental (LEWIS, 1979; LEE e FLAVELL, 2014).



**Figura 3 – Representação da etapa de evocação da memória proposta por Lewis em 1979.** A evocação é um processo complexo e bifásico que permite o acesso a informação previamente adquirida. (A) Um lembrete associado com o aprendizado é necessário para induzir a reativação do traço de memória. (B) A reativação consiste na passagem do traço de memória do estado inativo para o estado ativo. (C) Uma vez na conformação ativa, o traço pode ou não ser traduzido na expressão de um comportamento que foi codificado no momento do aprendizado. A seta conversora indica a passagem do traço do estado inativo para o ativo. O símbolo de “visto” e de “X” indicam a expressão ou não do comportamento, respectivamente. Adaptado de Lee e Flavell, (2014) e Lewis (1979).

## 1.7 RECONSOLIDAÇÃO

A partir da teoria da consolidação, por muito tempo acreditou-se que a memória adquirida e posteriormente consolidada se tornava fixa, estável e imutável e quando evocada, conferia apenas uma leitura “passiva” da informação previamente adquirida (DAVIS e SQUIRE, 1984). Entretanto, com o passar dos anos, a partir da premissa de que a memória consolidada poderia novamente se tornar lábil, houve a introdução do termo reconsolidação para definir o processo gradual de restabilização da memória (SARA, 2000), como demonstra a figura 4.



**Figura 4 – Representação da etapa de labilização e restabilização do traço de memória.** Após a reativação, durante a evocação, a memória pode seguir o caminho da desestabilização (labilização). Este período lábil é transitório, e gradualmente o traço passa a ser restabilizado, ou seja, reconsolidado. Após a reconsolidação, a memória novamente torna-se estável, e não mais suscetível a interferentes. Adaptado de Exton-McGuinness e colaboradores (2015).

A reativação proposta por Lewis em 1969 repercutiu de maneira impactante para a época ao desafiar a hipótese da consolidação, que postulava o estado fixo da memória. Trabalhos pioneiros conduzidos em animais realizados por Misanin, Miller e Lewis (1968) e também por Schneider e Sherman (1968) abriram os horizontes para a sessão de reativação. Os achados de que a sessão de reativação (realizada no mesmo ambiente do aprendizado inicial) era capaz de novamente deixar a memória instável, foram suportados pela redução da RC a partir de tratamentos amnésicos como o choque eletroconvulsivo. Na época, este fenômeno foi denominado de “amnésia dependente de pistas”. Desta forma, ao contrário do que se pensava até então, a memória consolidada não era imutável e poderia novamente se tornar instável suscetível à modulação. A desestabilização da memória, novamente requeria uma etapa de estabilização, ou como definida no fim da década de 90 e início dos anos 2000 de “reconsolidação” (PRZYBYSLAWSKI e SARA, 1997; SARA, 2000).

Como mencionado anteriormente, a proposta da natureza lábil e a teoria do estado ativo e inativo da memória hipotetizada por Lewis (1979), não repercutiu da maneira merecida na comunidade científica da época. Longe dos holofotes e parcialmente esquecida por cerca de 20 anos, foi apenas no final da década de 90 e início dos anos 2000, que a restabilização foi revivida e alavancada. A ascensão dos estudos acerca da reconsolidação iniciou após um trabalho conduzido por Przybylski

e Sara em 1997. Neste trabalho, foi evidenciado que o antagonismo de receptores NMDA após a sessão de evocação era capaz de comprometer a posterior retenção da memória (PRZYBYSLAWSKI e SARA, 1997). Outros trabalhos reforçaram esses achados, e sugeriram que outros tipos de receptores também poderiam participar deste processo (PRZYBYSLAWSKI et al., 1999) e a descrição da reconsolidação ganhou ainda mais força através do trabalho de Sara (2000).

Neste mesmo ano, o “xeque mate” da teoria de que a memória era imutável aconteceu e convenceu a comunidade científica através do trabalho realizado por Nader e colaboradores (2000). Nesse trabalho, os autores demonstraram que a reativação deixava a memória lábil e uma nova onda de síntese de proteínas dentro de um período de tempo específico era necessário para a restabilização da memória. Esses achados levaram a sugestão de que a reconsolidação compartilhava vias com a consolidação e também sugeriram a existência de uma “janela temporal” de restabilização do traço de memória.

Em conjunto, os trabalhos mencionados impulsionaram de maneira majestosa os estudos acerca da reconsolidação da memória, com especial destaque para memórias aversivas (NADER e HARDT, 2009; ALBERINI e LEDOUX, 2013; LEE et al., 2017). Apesar de diversos estudos reforçarem a existência da reconsolidação, este processo não pode ser extrapolado como uma propriedade de ocorrência certa (FORCATO et al., 2007; NADER e HARDT, 2009; FERNANDEZ et al., 2017). Nem todos os estudos demonstram a ocorrência da reconsolidação (CAMMAROTA et al., 2004), sugerindo que possam existir condições que a limitam (WANG et al., 2009).

A inserção da reconsolidação como uma etapa do processamento da memória despertou a curiosidade dos cientistas em esclarecer os mecanismos que a subsidiam. É importante ressaltar que quando o termo reconsolidação é empregado, é pressuposto que o traço de memória passou pelo processo inicial de desestabilização, este, crucial para a modulação e a reconsolidação da memória. Ambos os processos compartilham sistemas gerais de sinalização, como por exemplo, o envolvimento de receptores NMDA (MILTON et al., 2013). Entretanto, vias específicas nos sistemas neurais são minuciosamente ativadas e recrutam de maneira diferenciada subunidades de receptores e cascatas de sinalização intracelular.

O processo de desestabilização é dependente da degradação de proteínas, esta por sua vez, mediada pelo complexo ubiquitina-



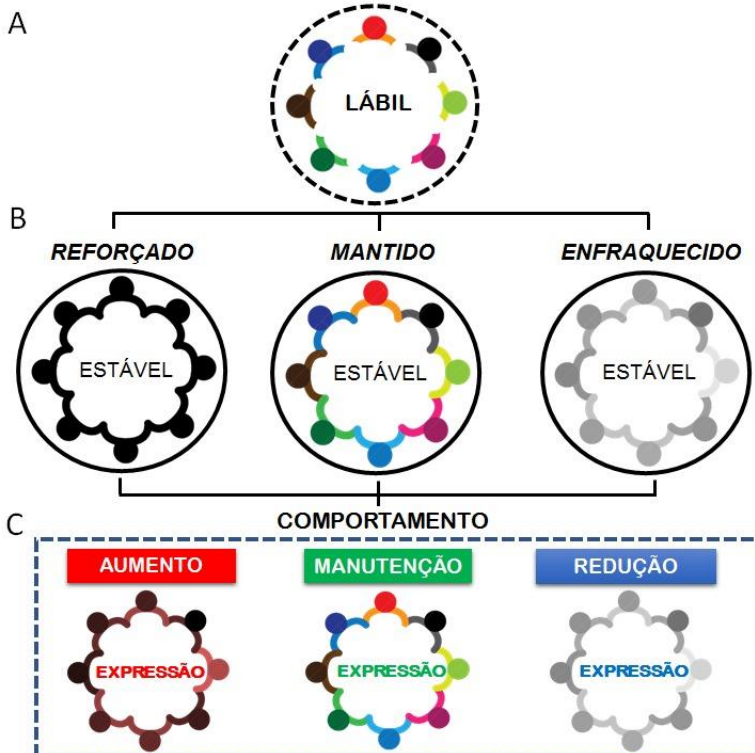
proteossoma que é regulado pela cinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII) (JAROME et al., 2016; LEE et al., 2008; SOL FUSTIÑANA et al., 2014). Quanto aos receptores AMPA e NMDA, é sugerida a participação de subunidades específicas na indução da desestabilização da memória aversiva. Por exemplo, a alteração temporal bifásica na expressão de receptores AMPA contendo a subunidade GluA<sub>2</sub> está envolvida na desestabilização (LOPEZ et al., 2016; RAO-RUIZ et al., 2012). O receptor NMDA participa de maneira direta desse processo. O antagonismo seletivo de receptores NMDA contendo GluN<sub>2</sub>B pelo ifenprodil, impede a desestabilização da memória (MILTON et al., 2013). Ainda, estudos apontam que a ativação de receptores CB1 e canais de cálcio dependente de voltagem do tipo L (SUZUKI et al., 2008) também são fatores cruciais para a desestabilização da memória. Na prática, a ausência de desestabilização pode ser evidenciada pela ausência do efeito amnésico sobre a expressão da memória (BEN MAMOU et al., 2006; MONTI et al., 2016).

Quanto aos mecanismos acerca da reconsolidação, ocorre a participação da síntese de proteínas (NADER et al., 2000; LATTAL et al., 2004), do aumento na proporção de receptores NMDA contendo GluN<sub>2</sub>A (MILTON et al., 2013) e da promoção de LTP no HPC (LIU et al., 2004). Estudos também sugerem que a translocação de receptores AMPA, engajada na desestabilização da memória, é revertida ao longo do tempo de restabilização (RAO-RUIZ et al., 2011; JAROME et al., 2012). A ativação de fatores de transcrição também assume papel importante no processo de reconsolidação. Marcadores como o BDNF (Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês “Brain-derived Neurotrophic Fator”, e Zif268 (HALL et al., 2001; ALBERINI, 2009) que são ativados através de cinases como a ERK (do inglês, extracelular signal-regulated kinase) são requeridos na reconsolidação da memória aversiva e não aversiva (DUVARCI e NADER., 2004; MATSUDA et al., 2015).

Como exposto anteriormente, fatores fisiológicos e ambientais podem impedir que a reconsolidação aconteça. Diversos fatores são propostos como limitantes da reconsolidação (LEE, 2009). Dentre eles, fatores ligados ao traço, como a intensidade ou força da memória (GAZARINI et al., 2013; ESPEJO et al., 2016; SOETER e KINDT, 2011; WANG et al., 2009) e a idade da memória (ALBERINI, 2005; SUZUKI et al., 2004). Fatores operacionais também conferem limitações, e dentre eles destacam-se: (1) o tempo da sessão de reativação (BUSTOS et al., 2009; DUDAI, 2012; MILTON et al., 2013, POWER et al., 2006), (2) o erro de predição (EXTON-MCGUINNESS et al., 2015; PEDREIRA et

al., 2004; SEVENSTER et al., 2013, 2014), (3) a influência do ambiente onde irá ocorrer a sessão de evocação da memória (BUSTOS et al., 2009; MARIN, 2017; STERN et al., 2012), este último ponto, particularmente controverso pois sofre interação com a intensidade da memória consolidada. Apesar de diversas condições limitarem a indução da reconsolidação, estas mesmas condições também são importantes para a melhor compreensão dos eventos que envolvem a reconsolidação.

A importância da reconsolidação no processamento dinâmico da memória é bem reconhecida na comunidade científica, e alguns processos que a subsidiam são apontados (Figura 5). Entre eles, a manutenção e a atualização fornecem vasto campo de investigação para diversos grupos de pesquisa (RODRIGUEZ-ORTIZ et al., 2005; YE et al., 2017; DE OLIVEIRA ALVARES et al., 2013; FORCATO et al., 2014; GISQUET-VERRIER et al., 2015; HAUBRICH et al., 2015; LEE, 2009).



**Figura 5 – Representação esquemática da maleabilidade do traço de memória.** (A) após a desestabilização B) o traço de memória lábil pode seguir os caminhos do reforço, da manutenção ou do enfraquecimento. (C) Estas manipulações podem direcionar diferentes saídas comportamentais.

O hipocampo (HPC) apresenta diferenças no processamento de tarefas espaciais entre os sexos em roedores (MAREN et al., 1994; GUPTA et al., 2001; JONASSON et al., 1997; MARKUS e ZECEVIC, 1997). Apesar da reconsolidação ser alvo frequente de pesquisas relacionadas à memória aversiva, pouco se sabe sobre esta fase do processamento mnemônico em representantes do sexo feminino. A maioria dos estudos não-clínicos que abordam a reconsolidação são conduzidos em modelos laboratoriais que utilizam machos. Já na prática clínica, são escassos os estudos se propõem a investigar este fenômeno exclusivamente em mulheres (DREXLER et al., 2016; AIKINS, 2015).

Portanto, o estudo da reconsolidação em fêmeas pode fornecer informações cruciais sobre como este processo funciona de maneira fisiológica e em patologias associadas. Além disso, a elucidação de mecanismos específicos desta fase em fêmeas pode ajudar na compreensão das vias que suportam memórias resistentes à labilização em mulheres na prática clínica.

## 1.8 EXTINÇÃO DA MEMÓRIA

A evocação permite o acesso à memória previamente armazenada e pode direcionar dois processos temporalmente distintos. Um deles, já mencionado anteriormente, é a reconsolidação, e o outro é o processo de extinção da memória (SUZUKI et al., 2004).

A extinção da memória foi descrita inicialmente por Pavlov (1927), através do aprendizado associativo apetitivo. Pavlov observou que re-exposições prolongadas, ou sucessivas ao EC, na ausência do EI, promoviam a redução temporária da RC, denominado por ele de extinção. Apesar do nome sugerir, a extinção não resulta na eliminação do aprendizado inicial, e a RC tende a ser recuperada.

Atualmente, duas teorias principais são apontadas como “elementares” no entendimento da extinção da memória, entretanto, nenhuma delas é capaz de explicar totalmente os resultados comportamentais e moleculares que a circundam. Logo, não há um

consenso. Nos próximos parágrafos, iremos abordar brevemente os aspectos de cada uma delas, em concordância com Myers e Davis (2007).

A primeira teoria postula a modulação de representações internas entre as pistas do aprendizado (EC e/ou EI) com situações, ou ambientes, no qual o organismo está inserido. A extinção, neste caso, modula componentes emocionais atrelados ao aprendizado e enfraquece a representação interna de que  $EC = EI$ . Essa modulação é capaz de reduzir a RC e age como uma espécie de “máscara” transitória sobre a expressão da memória (RESCORLA, 1979). A segunda teoria propõe que a resultante da extinção é um novo aprendizado associativo de que  $EC \neq EI$  (BOUTON, 1991). Essa nova memória inibe, sobrepõe ou compete (QUIRK e MUELLER, 2008) com a memória original para a supressão da RC. Vale ressaltar que ambas as teorias concordam com a premissa de que o traço original persiste mesmo após a ocorrência da extinção (RESCORLA e WAGNER, 1972).

De maneira geral, durante a aquisição da memória aversiva contextual, o HPC codifica a informação contextual e envia projeções para a BLA que agrega a informação emocional provocada pelo EI. Quando em contato com a pista contextual aprendida, o circuito hipocampal recrutado durante o aprendizado, ou pelo menos parte dele (ROY et al., 2017), é reativado, e ativa a BLA que se conecta com a amígdala central (CeA) e modula a expressão da resposta defensiva condicionada (QUIRK e MULLER, 2008). Na extinção, o circuito descrito anteriormente, em conjunto com o CPFm, suporta esse processo (MILAD e QUIRK, 2002; QUIRK e MUELLER, 2008; MAREN e QUIRK, 2004). Neste caso, a interação do circuito entre HPC e CPFm, mais precisamente com a região do córtex infralímbico, é fortalecida através de projeções excitatórias para as células intercaladas da amígdala (ITCs) que são neurônios GABAérgicos e, portanto, exercem efeito inibitório sobre a amígdala central (CeA) e BLA. A ativação desse circuito culmina na redução da RC, e parece ser fundamental para o sucesso da extinção.

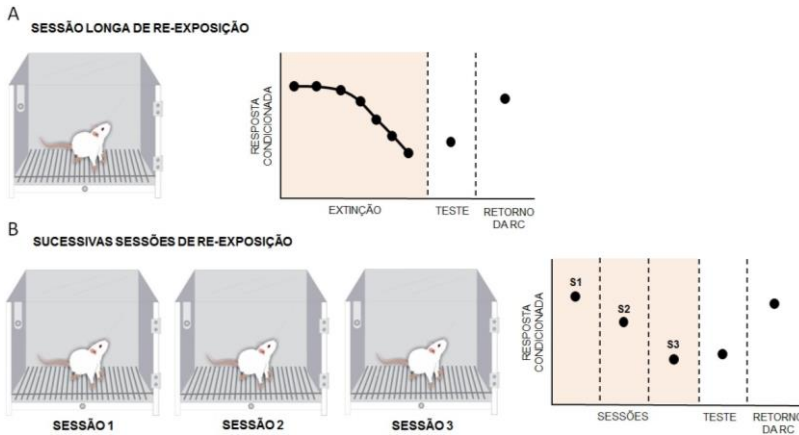
Estudos recentes em roedores têm demonstrado o papel dos receptores NMDA na extinção da memória aversiva. O antagonismo ou agonismo desse receptor prejudica (SZAPIRO et al., 2003; SIERRA-MERCADO et al., 2011) ou facilita (WALKER et al., 2002; YANG e LU, 2005; YAMAMOTO et al., 2008), respectivamente, a extinção da memória. Evidências suportam que a neurotransmissão GABAérgica via receptores GABA-A, está associada à facilitação (HARIS e WESTBROOK, 1998) e ao prejuízo da consolidação da extinção (BUSTOS et al., 2009; LIN et al., 2009).

Em relação às vias de sinalização intracelular envolvidas com a extinção da memória, as cinases ERK, MAPK, PKA, CAMK, PI3k também são requeridas no processo de estabilização da extinção (SZAPIRO et al., 2003; ORSINI e MAREN, 2012; HERRY et al., 2006). Genes que regulam e codificam a síntese proteínas também participam da extinção da memória. Por exemplo, o aumento na expressão de zif268 e c-Fos em regiões do CPFm, HPC e BLA (ORSINI et al., 2012) estão elevados após a sessão de extinção. Ainda, a participação do BDNF e da Calcineurina (CaN) (CHATWAL et al., 2006; MERLO et al., 2014) são bem associados com o processo de extinção (PETERS et al., 2010; MERLO et al., 2014).

Uma das principais limitações da extinção é a supressão temporária da expressão da RC. Como já mencionado, a extinção da memória não resulta na eliminação, ou deleção da memória original, logo esta “memória latente” pode ser novamente expressa. O sucesso da extinção depende de fatores temporais, sensoriais e espaciais (MYERS e DAVIS, 2007), e o retorno da RC é baseado nesses três componentes (BOUNTON, 2006). Ao longo de um intervalo de tempo, a memória pode retornar através da recuperação espontânea (BOUNTON, 2006; RESCORLA, 2004). Ainda, a RC pode retornar devido a um segundo evento aversivo, através da reinstalação (BOUNTON e BOLLES, 1979a; WESTBROOK, 2002), ou pelo contato com componentes associados ao aprendizado que não foram extintos, através da renovação (BOUNTON e RICKER, 1994). Nas três situações mencionadas, o retorno da memória pode ser ocasionado devido ao estado interno semelhante ao do aprendizado inicial. Este estado, direta ou indiretamente, pode levar a ativação do conjunto neuronal que suporta a memória aversiva e, novamente, desencadear a expressão da RC (BOUNTON, 2006). A recuperação espontânea, a reinstalação e a renovação de maneira isolada, ou em conjunto, constituem o padrão ouro para avaliar as intervenções sobre a extinção da memória. Esses fenômenos possibilitam aos pesquisadores estipular se o traço de memória foi atualizado, ou modulado, no nível da expressão comportamental.

Do ponto de vista fisiológico e/ou adaptativo, a extinção permite ao organismo modular os componentes espaciais, temporais, emocionais que foram vinculados a uma memória. Esta ação é necessária para regular quando a RC deve ou não ser expressa. O fato da memória não ser eliminada, desempenha o papel de auxiliar na flexibilidade da expressão da RC, quando em contato com situações que podem resultar na interpretação de uma pista associada ao estímulo aversivo, que possa

remeter a situações de ameaça à integridade do organismo (SOTRES-BAYON e QUIRK, 2010). A figura 6 exemplifica duas estratégias usuais na extinção da memória aversiva contextual.



**Figura 6 – Estratégias para extinção da memória aversiva contextual.** (A) A exposição prolongada ao EC na ausência do EI, conduz a redução da expressão da RC, e no teste subsequente, indicando que houve a retenção da extinção. (B) Repetidas re-exposições ao EC na ausência do EI conduzem gradativamente a redução da RC. Ambas estratégias, A e B, podem sofrer os processos de reinstalação, recuperação espontânea e renovação e convergem no retorno da RC. Em A e B, a porção sombreada do gráfico indica a RC durante a (s) sessão (ões) de extinção. Os círculos da cor preta indicam o nível da RC. A sessão de Teste indica a retenção da extinção e o retorno da RC os processos de recuperação espontânea, reinstalação da memória aversiva contextual ou a renovação. S1, S2 e S3 indicam as sessões de extinção 1, 2 e 3 respectivamente. Adaptado de Myers e Davis (2007).

### 1.9 RECONSOLIDAÇÃO versus EXTINÇÃO

A evocação é um processo dinâmico que permite o acesso a uma memória previamente adquirida. Este acesso pode direcionar dois processos comportamental e temporalmente distintos: reconsolidação ou extinção. Enquanto uma sessão de re-exposição breve pode induzir a reconsolidação, o aumento da duração dessa sessão aumenta a probabilidade de abordar o processo de extinção da memória.

Do ponto de vista comportamental, a reconsolidação e a extinção seguem caminhos opostos. A reconsolidação realiza a manutenção, ou a atualização do conteúdo de uma memória (TRONSON e TAYLOR, 2007). Já a extinção, promove a modulação dos componentes emocionais vinculados e reduz a expressão do comportamento (MYERS e DAVIS, 2007).

Quanto à modulação farmacológica, o mesmo agente pode direcionar efeitos opostos sobre o comportamento. Após a reconsolidação, agentes amnésicos tendem a enfraquecer os circuitos neurais e/ou produzir efeito amnésico de maneira permanente sobre a memória (MILLER e SWEATT, 2006; DIEBEC et al., 2004; DUVARCI e NADER, 2004). Após a extinção, agentes amnésicos interferem na estabilização dos componentes emocionais vinculados e prejudicam a retenção da extinção (SANTINI et al., 2001, 2004; SUZUKI et al., 2004). Ambos, o prejuízo da reconsolidação, ou a sessão de extinção, resultam na redução da RC nos testes subsequentes. Entretanto, apenas a RC vinculada à extinção, tende a retornar (DUVARCI e NADER, 2004; QUIRK e MUELLER, 2008).

Nem toda sessão de evocação culmina na labilização da memória (BUSTOS et al., 2009; FORCATO et al., 2009; GISQUET-VERRIER, RICCIO, 2012; PEDREIRA et al., 2004; SEVENSTER et al., 2012). A reativação da memória apresenta quatro possíveis desfechos (DELORENZI et al., 2014): (1) A “mera” reativação do traço que pode dirigir a expressão do comportamento, mas, não é suficiente para gerar a desestabilização (BUSTOS et al., 2009), (2) a labilização, ou desestabilização, do traço que o deixa suscetível à modulação, mas a expressão do comportamento não é regra (MAMOU et al., 2006; LEE e FLAVELL, 2014) (3) um período transitório, de zona cinza ou “limbo” onde não há traço de memória dominante e conduz a ausência do efeito farmacológico sobre a expressão da RC (BUSTOS et al., 2009; MERLO et al., 2014; SUZUKI et al., 2004) (4) a extinção da memória ditada pelo aumento no tempo de re-exposição (ALFEI et al., 2015; PEDREIRA e MALDONADO, 2003). A passagem gradual da reconsolidação para a extinção ao longo de uma sessão de re-exposição é separada pelo período insensível ou de limbo. A descoberta deste período transitório e insensível no nível comportamental levou à sugestão de três modelos (Figura 7) que podem explicar a transição do fenômeno de reconsolidação para a extinção em função do tempo de apresentação do EC (MERLO et al., 2014).

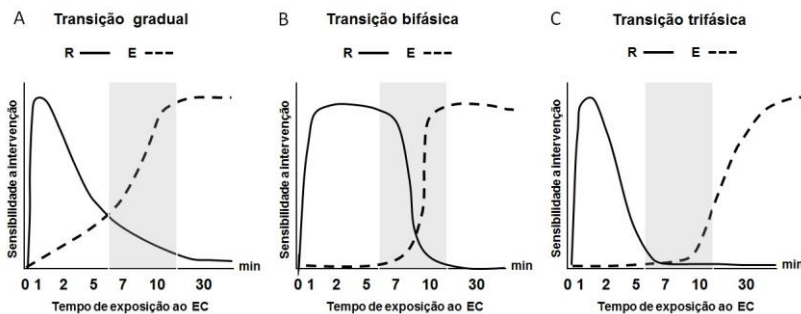
Apesar da evocação ser o processo comum entre a reconsolidação e a extinção, no âmbito celular e molecular esses processos apresentam identidade parcialmente distinta. Ambas recrutam receptores NMDA (SUZUKI et al., 2004), dependem de síntese proteica (VIANNA et al., 2001; SUZUKI et al., 2004), compartilham fatores de transcrição (MAMIYA et al., 2009) e a ativação de cinases como a ERK 1/2 (HERRY et al., 2006; MERLO et al., 2014,2018), a PKA e a MAPK (SZAPIRO et al., 2003). Entretanto, vias específicas são cruciais para a extinção, mas não para a reconsolidação, como o aumento dos níveis de BDNF no HPC e CaN na BLA (HELDT et al., 2007; MERLO et al., 2014). O aumento do BDNF no HPC ventral é capaz de aumentar a taxa de disparo neuronal no córtex infralímbico e auxilia no processo de extinção da memória aversiva em roedores (ROSAS-VIDAL et al., 2014). Na BLA, o aumento da CaN é associado com o aumento do tempo de re-exposição, e comportamentalmente, com a redução da RC em roedores (MERLO et al., 2014). A ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF –  $\kappa$ B) e o consequente aumento nos níveis de CaN, são acionados de acordo com o tempo de sessão de re-exposição (DE LA FUENTE et al., 2011) e caracteriza a passagem de um processo para o outro ao longo da sessão de re-exposição. Recentemente, Merlo et al., (2018) apontaram a pERK como um marcador importante para o limbo. Nesse período, os níveis de pERK não estão elevados e podem indicar que a memória se encontra no período transitório entre a reconsolidação e a extinção, e pode ser um indicativo de ausência de efeito farmacológico sobre a memória.

A participação dessas vias durante a sessão de re-exposição evidencia a natureza dinâmica da evocação da memória e representa um leque de oportunidades para a investigação dos mecanismos neurobiológicos de memórias aversivas.

Visto que a sessão de re-exposição é capaz de conduzir a pelo menos quatro processos (DELORENZI et al., 2014), é amplo o corpo de evidências demonstrando que a reconsolidação e a extinção além de competirem entre si no nível celular e molecular, são processos ditados pelo tempo de re-exposição ao EC (MERLO et al., 2014, 2018; SUZUKI et al., 2004). Uma muito breve sessão de re-exposição pode não ser o suficiente para desencadear a desestabilização da memória, e possibilitar a modulação do traço. Entretanto, essa mesma sessão possibilita a expressão de um comportamento associado, e neste caso, promove a “mera” reativação da memória. Já o aumento no tempo de re-exposição pode favorecer a desestabilização e permitir que o traço seja modulado



através de intervenções farmacológicas ou comportamentais que podem comprometer ou favorecer a reconsolidação da memória. Aumentando ainda mais a sessão de re-exposição, um período transitório se faz presente. Nessa condição, interferências realizadas não são bem-sucedidas, e pouco ainda se sabe sobre este fenômeno. Por fim, uma longa sessão de re-exposição pode conduzir o traço de memória para a extinção (MYERS e DAVIS, 2007). Nessa fase, o objetivo é reduzir a RC, entretanto, intervenções realizadas após a extinção, geralmente, apresentam efeito oposto do visualizado na reconsolidação. Assim, a vulnerabilidade da memória a agentes amnésicos depende do tempo de re-exposição e do sucesso da sessão em desencadear um processo dominante.



**Figura 7 – Modelos de transição da reconsolidação para a extinção.** (A) Transição gradual, com estados “transitórios” entre a reconsolidação e a extinção que são desencadeados por diferentes graus de engajamento de cada fenômeno. (B) Transição bifásica, ou de forças opostas e equivalentes em que reconsolidação e extinção são mutualmente exclusivas e um fenômeno não é engajado ao mesmo tempo que outro. (C) Transição trifásica iniciando com a reconsolidação seguida pelo período de “limbo” e extinção como processo final. R: reconsolidação; E: extinção; EC: estímulo condicionado, neste estudo representado pelo contexto. O tempo é apresentado em minutos (min) de exposição ao contexto. A área sombreada indica o período insensível à interferência farmacológica. Adaptado de Merlo et al., 2014.

## 1.10 MEMÓRIAS AVERSIVAS E FÊMEAS

Em 2014, o Instituto Nacional da Saúde (NIH, do inglês, National Institutes of Health) deu início ao plano de inclusão de sexo e gênero como variável na pesquisa básica e clínica, respectivamente. Em junho de 2015, a mesma instituição realizou a divulgação de um guia incentivando pesquisadores a incluir o sexo como uma variável biológica (COLLINS e TABAK, 2014; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2015). Este tema, de maneira geral, foi bem recebido pela comunidade científica e conduziu a diversas opiniões e manifestações a favor (CLAYTON, 2016; JOEL e MCMARTHY, 2017; MILLER et al., 2017; SHANSKY e WOOLLEY, 2016), e poucos questionaram a importância desta inclusão (RICHARDSON, 2015).

No campo da neurociência, os estudos conduzidos com fêmeas abrangem uma proporção inferior quando comparado aos estudos conduzidos com machos. Essa proporção chega a ser de 5,5 estudos em machos para cada 1 estudo realizado com fêmeas (BEERY e ZUCKER, 2011). O crescimento rápido das publicações evidenciando diferenças sexuais nas funções cerebrais faz desse tema alvo de discussão frequente.

Apesar dos estudos acerca da reconsolidação e da extinção terem iniciado há muitas décadas, pouco se sabe sobre estas fases do processamento mnemônico em representantes do sexo feminino. A maioria dos estudos não-clínicos que abordam a reconsolidação e a extinção são conduzidos em modelos laboratoriais que utilizam machos. Já na prática clínica, são escassos os estudos se propõem a investigar este fenômeno exclusivamente em mulheres (AIKINS, 2015; DREXLER et al., 2016; LEBRON-MILAD e MILAD, 2012).

Em humanos, a incidência de transtornos psiquiátricos é de origem multifatorial e parece estar, pelo menos em parte, relacionada às diferenças sexuais. Essa afirmação emerge de estudos demonstrando a maior incidência destas patologias em mulheres (EATON et al., 2012; KESSLER et al., 2012; SHANSKY, 2015). Apesar dos estudos apontarem mulheres como o gênero de maior incidência dessas doenças, esse fato não faz das fêmeas na pesquisa básica o modelo de estudo mais utilizado. A avaliação de comportamentos relacionados às respostas defensivas condicionadas e a comportamentos tipo-ansioso segue sendo executadas e, em muitos casos, padronizada para a resposta produzida por machos (KOKRAS e DALLA, 2014).

Portanto, é clara a necessidade de incluir o sexo como variável biológica na pesquisa básica e permitir a garantia de que as peças fornecidas para a pesquisa clínica não apresentem viés de sexo e

colaborem para a maior compreensão e para o avanço no tratamento de doenças que envolvam o processamento da memória aversiva (BEERY e ZUCKER, 2011).

Quando avançamos para os estudos no processamento de memórias aversivas, as diferenças de sexo e gênero são, e vem sendo, documentadas (MCLEAN e ANDERSON, 2009; MILAD et al., 2006; MAENG e MILAD, 2015; STARK, 2006). Por exemplo, em roedores, o HPC apresenta diferença no processamento de tarefas espaciais entre os sexos (MAREN et al., 1994; GUPTA et al., 2001). Evidências suportam que parte dessas diferenças na plasticidade hipocampal seja subsidiada pelos hormônios gonadais femininos, entre eles, os estrógenos e progestágenos (MAREN et al., 1994; GRESACK et al., 2009; BARKER e GALEA, 2010). O estradiol (E2, hormônio gonadal feminino da classe dos estrógenos) no HPC pode interferir diretamente no processamento da memória contextual em fêmeas, o estradiol também pode estar engajado na expressão da RC contextual. Por exemplo, fêmeas expressam menor nível de congelamento e extinção facilitada quando comparadas a machos em tarefas contextuais (GUPTA et al., 2001; MAREN et al., 1994). Em fêmeas, durante a extinção, foi demonstrado o aumento sustentado de ondas específicas no córtex pré-límbico, mas não no córtex infralímbico, em relação a machos. Esse aumento foi relacionado à maior expressão da RC durante a sessão de extinção no paradigma de condicionamento clássico ao som (FENTON et al., 2016).

Atualmente na prática clínica, tem se chamado atenção para as individualidades e componentes multifatoriais que englobam a memória aversiva, bem como, reforçam a importância de facilitar a comunicação entre os estudos clínicos e não clínicos (KINDT, 2018). Por exemplo, patologias associadas ao estresse são cerca de 2 vezes mais prevalentes em mulheres (KESSLER et al., 2012), e estudos recentes apontam que o sexo deve ser levado em consideração na modulação da extinção da memória aversiva na prática clínica (LEBRON-MILAD e MILAD, 2012).

No âmbito não-clínico, a pesquisa sobre a memória aversiva contextual é liderada pelo uso de machos (BEERY e ZUCKER, 2011), e muitos estudos que utilizam fêmeas, realizam a OVX para “amenizar” possíveis efeitos do ciclo estral ou estudar especificamente a ausência dos hormônios (GRAHAM et al., 2013, 2014). Contudo, a OVX é uma técnica cirúrgica e limita a ocorrência de processos fisiológicos no processamento da memória, e pode conduzir a resultados que dificilmente podem ser translacionados para a prática clínica ou, que beneficiam uma

parcela restrita de indivíduos. Os hormônios gonadais caracterizam as fêmeas, e seus efeitos sobre o encéfalo iniciam desde o início do desenvolvimento do organismo (ROSENFELD, 2017). Ignorar o uso de fêmeas na pesquisa, compromete o avanço da ciência básica e o melhor entendimento dos processos mnemônicos (CLAYTON, 2016). Dessa forma, chamamos a atenção para importância de considerar fêmeas naturalmente cíclicas no estudo da memória aversiva contextual e viabilizar resultados que englobam a flutuação fisiológica dos hormônios gonadais.

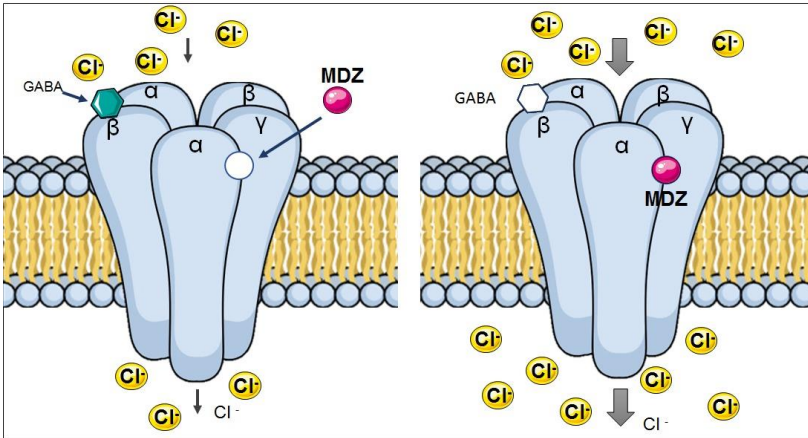
Como relatado anteriormente, a diferença entre os sexos no processamento da memória aversiva contextual é bem estabelecida (MAREN et al., 1994; GUPTA et al., 2001) e muitos achados em fêmeas são similares aos achados em mulheres (MILAD et al., 2006; ZEIDAN et al., 2011). Entretanto, a reconsolidação e a extinção da memória aversiva contextual em fêmeas segue pouco compreendida. Muitos mecanismos e vias que sustentam esses processos permanecem desconhecidos, ou pouco compreendidos em representantes do sexo feminino, tanto na prática clínica, quanto em animais de laboratório. Desta forma, um dos desafios atuais dos pesquisadores é responder as perguntas que giram em torno desse cenário. Por exemplo, como estes mecanismos se relacionam com os fatores temporais da sessão de evocação? Quais são as vias que apresentam particularidades em fêmeas? Em quais regiões esses mecanismos são cruciais? Como essas vias e regiões suportam as diferenças entre os sexos no processamento da memória? Muitas dessas perguntas seguem sem resposta. Contudo, estudos suportam que diferentes paradigmas (DALLA e SHORS, 2009; MILAD et al., 2009), estratégias de enfrentamento (ARCHER, 1975; GRUENE et al., 2015), o HPC (MAREN et al., 1994) e os hormônios gonadais (MILAD et al., 2006; MAENG e MILAD, 2015) em conjunto, ou isoladamente, podem auxiliar na melhor compreensão do processamento da memória aversiva em fêmeas.

Portanto, o estudo da reconsolidação e da extinção em fêmeas pode fornecer informações cruciais sobre como esses processos funcionam de maneira fisiológica e em patologias associadas. Além disso, a elucidação de mecanismos específicos desses fenômenos em fêmeas pode ajudar na compreensão das vias que sustentam memórias resistentes à labilização e à extinção em mulheres na prática clínica. Para isso, modelos experimentais utilizando fêmeas como objeto de estudo são fundamentais para fornecer ferramentas importantes para o tratamento desses distúrbios em humanos, especialmente em mulheres.

## 1.11 MIDAZOLAM COMO FERRAMENTA FARMACOLÓGICA PARA O ESTUDO DA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL

O envolvimento da neurotransmissão GABAérgica (GABA, ácido gamma-amino-butírico) é bem documentada na literatura em diversas fases do processamento da memória aversiva (HARRIS e WESTBROOK, 1998b; MAKKAR et al., 2010; HENRRY et al., 2010). Esse sistema é engajado de maneira importante nos processos de consolidação, reconsolidação, extinção e também na expressão da RC. Curiosamente, a manipulação da neurotransmissão GABAérgica apresenta papel diferenciado sobre a expressão da memória aversiva de acordo com a tarefa, sítio de infusão e momento da administração da droga. Ainda, a modulação GABAérgica sofre grande influência do tempo da sessão de reativação que precede a administração da droga. A potencialização do sistema GABAérgico após uma breve sessão de evocação/reativação conduz o prejuízo de reconsolidação, enquanto que a potencialização deste sistema após uma longa sessão prejudica a retenção da extinção (HARRIS e WESTBROOK, 1999). De forma geral, a reconsolidação e a extinção da memória dependem de um mecanismo comum de neurotransmissão GABAérgica, ou seja, ambos os processos podem ser prejudicados e/ou facilitados no caso da extinção. Desta forma, a modulação da neurotransmissão GABAérgica compõem um alvo promissor para o estudo da neurobiologia envolvida no processamento da memória aversiva.

O midazolam (MDZ) da classe dos benzodiazepínicos (BDZs) é um modulador alostérico positivo dos receptores GABA-A. O MDZ se acopla a um sítio de ligação específico, localizado na interface das subunidades  $\gamma$  e  $\alpha$  (MEHTA e TICKU, 1999). Quando acoplado ao sítio de ação, o resultado é abertura de canais para cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) que induz aumento no influxo deste íon para o meio intracelular, culminando na hiperpolarização da célula (Figura 8) e promovendo o aumento da inibição neuronal (JOHNSTON, 1996). O MDZ é uma droga utilizada na prática clínica para amenizar sintomas ligados à ansiedade e promover sedação. Na pesquisa básica, o MDZ tem sido amplamente utilizado na modulação da memória aversiva. Diversos estudos demonstraram que o efeito do MDZ sobre a reconsolidação da memória não é recuperado, sugerindo a mudança sustentada no estado interno do animal nessa condição (BUSTOS et al., 2006, 2009, ZHANG e CRANNEY, 2008; PAIN et al., 2002).



**Figura 8 – Representação esquemática do receptor GABAérgico do tipo A e a ação do MDZ.** Adaptado de Jacob e colaboradores (2008).

Dentre os efeitos do MDZ no estudo do processamento da memória aversiva em modelo animal, destacam-se: (1) o efeito bidirecional sobre RC de acordo com o tempo da sessão de re-exposição (BUSTOS et al., 2006, 2009; GAFFORD et al., 2005; MONTI et al., 2017) e (2) a prevenção dos efeitos do estresse sobre a memória (GIACHERO et al., 2013; MALDONADO et al., 2011; MANZANARES et al., 2005). Entretanto, os estudos associando a neurotransmissão GABAérgica e a memória aversiva contextual são comumente conduzidos utilizando roedores machos, e nenhum trabalho até o presente momento, demonstrou o efeito do MDZ sobre diferentes tempos de sessão de re-exposição em ratas.

## 2 HIPÓTESE

---

Como apresentado anteriormente, a duração da sessão de reativação é crucial na indução da reconsolidação ou extinção da memória aversiva (SUZUKI et al., 2004). Estudos anteriores demonstraram que as vias que sustentam a reconsolidação e a extinção da memória aversiva podem ser diferentes entre os sexos (MAENG e MILAD, 2015; MAENG et al., 2017).

A ausência de estudos no campo da reconsolidação e da extinção da memória aversiva contextual em fêmeas levanta o questionamento de que esses dois processos sejam diferentes nelas. Portanto, a caracterização desses processos, através de diferentes tempos de reativação, é necessária para memórias aversivas contextuais em fêmeas.

De acordo com a literatura e problemática apresentadas, a hipótese deste trabalho é que a transição da reconsolidação para a extinção da memória aversiva contextual em fêmeas é caracterizada por uma dissociação entre a vulnerabilidade a agentes amnésicos e a expressão da resposta defensiva.

## 3 OBJETIVOS

---

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização temporal da reconsolidação e da extinção de uma memória aversiva contextual em fêmeas utilizando o MDZ sistêmico como ferramenta farmacológica para o prejuízo da restabilização e consolidação da extinção.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar o efeito da fase do ciclo estral sobre a expressão da memória aversiva contextual
- ✓ Caracterizar o efeito do midazolam sobre a memória aversiva contextual após 1, 2, 5, 7, 10 ou 30 min de reexposição

- ✓ Investigar o efeito do midazolam após a segunda re-exposição ao contexto pareado
- ✓ Avaliar se o efeito do midazolam sobre a memória aversiva é duradouro
- ✓ Investigar se a administração do midazolam após diferentes tempos de re-exposição ao contexto pareado apresenta reinstalação da memória aversiva
- ✓ Avaliar se o efeito do midazolam é específico para memórias no estado ativo
- ✓ Investigar se o efeito do midazolam apresenta um período temporal crítico de ação após a evocação

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 282 animais (*Rattus norvegicus*) Wistar fêmeas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, com idade entre 90 – 100 dias e peso aproximado de 180 e 240 g. As ratas foram alocadas em caixas plásticas padrão (36 x 30 x 15 cm) com serragem, em um número máximo de 5 animais por caixa. Durante sua permanência no biotério, os animais foram mantidos em condições de temperatura e luminosidade controladas, com em ciclo de luz claro/escuro de 12 h (início da fase clara às 07:00 h) e temperatura mantida em  $21 \pm 2$  °C, com água e comida ad libitum. Todos os procedimentos deste trabalho foram executados mediante aprovação do comitê de ética para o uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (Ofício nº71/CEUA/PRPE/2012PP00766), bem como, foram respeitadas as normas internacionais do cuidado e bem-estar animal.

### 4.2 DROGAS

Midazolam (MDZ; 5 mg/Kg; Hipolabor, Brasil), foi diluído em solução salina estéril (0,9% v/v) para a concentração de 3 mg/mL e administrado pela via intraperitoneal (i.p.) em um volume total de 1,0 mL/Kg em todos os experimentos. A dose de MDZ utilizada neste estudo foi selecionada de acordo com trabalhos prévios que demonstraram efeito



amnésico desta droga sobre a memória aversiva em um paradigma de medo contextual em roedores machos (MONTI et al., 2017; ALFEI et al., 2015; PIÑEYRO et al., 2014; BUSTOS et al., 2009).

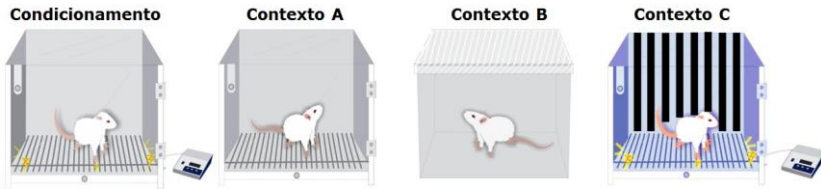
Cloridrato de ioimbina (IOI; 2 mg/Kg; Tocris, EUA), foi dissolvido em água destilada e administrado pela via intraperitoneal (i.p.) em um volume total de 1,0 mL/Kg em todos os experimentos em que esta droga foi utilizada. A dose de IOI utilizada no presente trabalho foi selecionada com base em experimentos preliminares realizados em fêmeas e em trabalhos anteriores do laboratório que demonstraram efeito da IOI em potencializar a consolidação da memória de medo contextual em roedores machos (MARIN, 2017; VANVOSSSEN et al., 2017).

### 4.3 CONDICIONAMENTO DE MEDO CONTEXTUAL

#### 4.3.1 Aparatos experimentais:

O condicionamento aversivo ao contexto foi realizado em uma caixa retangular (35 x 20 x 30 cm), com paredes laterais e traseira de alumínio, parede frontal e tampa removível de acrílico. Esta caixa foi denominada como Contexto A ou contexto não pareado ou não associado. O piso do Contexto A foi composto por barras de aço inoxidável de 3 mm de diâmetro com espaçamento entre as barras de 9 mm e conectado a um gerador de choques elétricos (Insight, Ribeirão Preto, Brasil). O gerador de choques acoplado a este contexto foi utilizado apenas no dia do treino para a aplicação dos estímulos elétricos nas patas dos animais (estímulo incondicionado, EI). Neste mesmo ambiente na ausência do EI, foram realizadas as sessões de Teste A que consistiu na avaliação da expressão da resposta defensiva condicionada ao contexto (nível de congelamento em porcentagem). Um segundo ambiente foi utilizado neste estudo, denominado como Contexto B, não pareado ou não associado. Este por sua vez, confeccionado em vidro transparente com formato cúbico (30 x 30 x 30 cm) e com tampa superior de acrílico. Este segundo ambiente, foi utilizado para avaliação e determinação de respostas defensivas generalizadas. Ainda, um terceiro ambiente nomeado como Contexto C foi utilizado para sessão de reinstalação da memória aversiva contextual. Confeccionado em acrílico cinza, com formato quadrado de 25 x 25 x 32 cm de altura e com tampa superior de acrílico. O piso da caixa utilizada foi composto por barras de aço inoxidável de 5 mm de diâmetro com espaçamento entre as barras de 10 mm e conectado a um gerador de

choques elétricos (Insight, Ribeirão Preto, Brasil). Modificações nas paredes deste ambiente foram efetuadas. Na parede posterior do Contexto C foram adicionadas faixas pretas com 1,5 cm de largura na disposição vertical com espaçamento de 1 cm entre cada faixa. Este ambiente foi utilizado para a aplicação de um único estímulo elétrico (EI) nas patas dos animais. Este procedimento foi denominado de sessão de reinstalação da memória aversiva contextual.

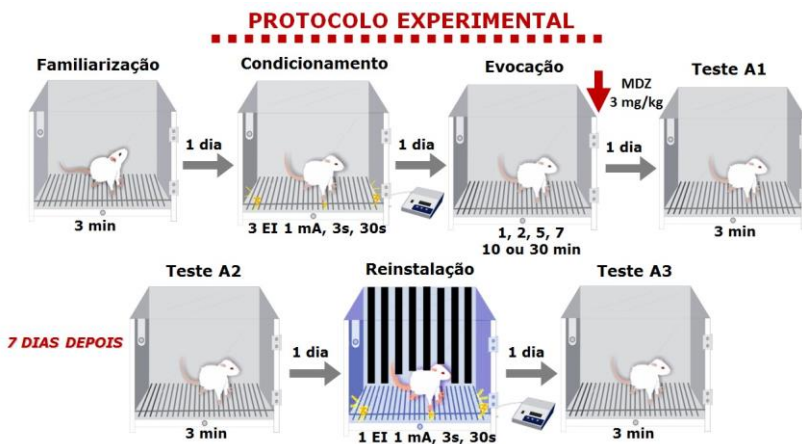


**Figura 9 – Ilustração dos ambientes utilizados neste estudo.** Em todos os experimentos realizados neste estudo, os animais foram familiarizados (ausência de EI) e condicionados (acoplado ao gerador de choques) no Contexto A. Nesse mesmo ambiente os animais foram submetidos a sessão de evocação da memória e testados em sequência nos Testes A (1 e 2 ou 3). Experimentos em que a sessão de evocação foi omitida, os animais permaneceram na caixa moradia e não foram expostos a nenhum dos ambientes citados. Para avaliação da resposta defensiva generalizada, os animais foram expostos ao Contexto B. Para os experimentos com sessão de reinstalação da memória, os animais foram expostos ao Contexto C para administração de um único EI.

#### 4.3.2 Protocolos:

O protocolo experimental básico utilizado neste estudo é graficamente ilustrado na figura 10. Entretanto, as alterações quanto ao curso temporal e ordem cronológica de exposições aos contextos serão destacadas e descritas quando se fizer necessário. O protocolo denominado de Reconsolidação ou Extinção compõe a sequência básica de sessões contendo: familiarização, treino, evocação, Teste A1 e A2, reinstalação e Teste A3 que variam de 12 – 22 dias em sua totalidade. Neste protocolo de reconsolidação ou extinção os animais inicialmente foram dispostos no Contexto A para a sessão de Familiarização durante 3 min. Neste ambiente, os animais permaneceram livres para exploração e aquisição da representação espacial do contexto A e em seguida, retirados do Contexto e devolvidos a caixa moradia. No dia seguinte, cada animal foi novamente exposto ao Contexto A para a sessão de Treino

(pareamento ou condicionamento). Durante esta sessão, os animais receberam após 30 s iniciais (período pré-choque) três estímulos elétricos nas patas (1 mA, 60 Hz, por 3 s) com intervalo entre cada estímulo de 30 s. No dia seguinte, os animais foram re-expostos ao Contexto A por 1, 2, 5, 7, 10 ou 30 min na ausência do EI para a sessão de Evocação (ou re-exposição). Durante esta sessão ocorreu a avaliação da retenção da memória adquirida no dia do treino (exceto para experimentos em que a esta sessão foi omitida). Após a sessão de evocação novas exposições foram efetuadas e denominadas sessões de Testes A (1, 2 e 3) por 3 min e de acordo com a ordem temporal de ocorrência. Para avaliação e determinação de respostas defensivas generalizadas, quando necessário, os animais passaram pelo Contexto B (não pareado ou não associado), designado como sessão de Teste B (1 ou 2) por 3 min. Para análise da reinstalação da memória aversiva, uma sessão de Reinstalação foi incluída. Um dia após o Teste A1 ou A2 (de acordo com o experimento), os animais foram dispostos no Contexto C para a administração de um único estímulo elétrico (1 mA, 60 Hz, por 3 s). Modificações externas ao contexto C foram efetuadas com a finalidade de tornar a sessão de reinstalação diferente da sessão de treino. Para tal, o Contexto C foi disposto sob uma superfície preta e a conformação espacial da sala foi alterada. Uma parede móvel que durante a sessão de treino ocupava posição paralela ao Contexto A, agora, sofreu rotação de 90° e passou a ocupar posição frontal ao Contexto C.



**Figura 10 – Protocolo experimental básico utilizado neste estudo.**

#### 4.3.3 Intervenções farmacológicas:

Para os experimentos de reconsolidação ou extinção da memória, as intervenções farmacológicas com MDZ foram executas imediatamente após a sessão de evocação, exceto para experimentos em que a sessão de evocação foi omitida ou experimentos fora da janela temporal de reconsolidação. Por outro lado, para os experimentos de memória potencializada, as intervenções farmacológicas foram realizadas imediatamente após a sessão de treino (administração sistêmica de IOI).

#### 4.3.4 Considerações procedimentais gerais:

Todos os procedimentos comportamentais foram executados sob luminosidade e temperatura controlada de 60 lux e 23 °C respectivamente e sucederam no período entre 13:00 h e 17:00 h. Antes de cada sessão comportamental, os animais foram dispostos em uma antessala sob as condições descritas por 40 min, ato definido como ambientação. Este procedimento foi adotado para reduzir o estresse ou desconforto dos animais pelo transporte até a sala de experimentação. O nível de congelamento foi avaliado manualmente e obtido através do tempo (em segundos) atingido em cada min das sessões (evocação, testes A e/ou B) expresso em porcentagem de tempo de congelamento total de cada sessão, transformados em curva temporal min a min ou em blocos de 2 min que serão especificados quando se fizer necessário. Os experimentos foram gravados por uma câmera de vídeo acoplada a um aparelho de DVD, permitindo a análise posterior do comportamento ocorrido. Durante as sessões comportamentais, a experimentadora permanecia na antessala e o comportamento do animal era acompanhado através do monitor acoplado a câmera de vídeo. Brevemente antes de cada sessão individual, o contexto utilizado era limpo com solução uma solução de etanol e água destilada a 10% (v/v).

#### 4.4 VERIFICAÇÃO DO CICLO ESTRAL

A verificação das fases do ciclo estral foi realizada através da citologia vaginal, obtida a partir de lavados vaginais coletados brevemente antes das sessões comportamentais adaptado de Marcondes,

Bianchi e Tanno (2002). Para o procedimento de coleta foi utilizada uma micropipeta com ponteira de plástico acompanhada de 30 microlitros de solução fisiológica (NaCl a 0,9%), ambos estéreis. As ratas foram gentilmente envoltas com flanela e a ponteira foi introduzida no canal vaginal cuidadosamente para que não houvesse estimulação da cérvix uterina (MARCONDES et al., 2002). Em seguida o lavado vaginal foi depositado em lâmina de vidro para observação da morfologia celular em microscópio óptico sob objetivas de 10 vezes. Três tipos celulares foram considerados: células epiteliais, células cornificadas e leucócitos e (LONG e EVANS, 1922). A caracterização de cada fase do ciclo estral seguiu de acordo com Goldman, Murr e Cooper (2007) utilizando a seguinte classificação:

Proestro: Predominância de células epiteliais nucleadas e arredondadas.

Estro: Predomínio de células cornificadas anucleadas e com formato irregular.

Diestro I: Leucócitos e células cornificadas em proporção semelhante.

Diestro II: Predomínio de leucócitos e muco.

#### 4.4.1 Considerações relacionadas ao ciclo estral:

Este estudo não teve como objetivo central investigar os efeitos de cada uma das fases do ciclo estral sobre o processamento mnemônico. Entretanto, para padronização do protocolo de condicionamento aversivo ao contexto, as ratas foram alocadas de acordo com as fases do ciclo estral: Proestro, Estro e Diestro I e II (unificadas) para determinação da expressão de congelamento no dia da sessão de evocação. Nos demais experimentos, cada grupo experimental, independentemente do tratamento, foi composto por um número similar de representantes de cada fase do ciclo estral mencionada acima, compondo desta forma, grupos heterogêneos em relação à fase do ciclo estral. É importante ressaltar que, a fase do ciclo levada em consideração para a alocação dos grupos foi definida de acordo com a fase do ciclo estral no dia da sessão de evocação. A sessão de evocação foi escolhida, pois as intervenções comportamentais e/ou farmacológicas, foco deste estudo, foram realizadas neste dia do protocolo experimental.

A unificação das fases diestro I e II levou em consideração o perfil semelhante entre estas duas fases referente aos hormônios FHS, LH, prolactina, E2 e a pequena variação de progesterona durante as fases diestro I e II ao longo do ciclo estral (BUTCHER et al., 1973). Além disso, esta estratégia de randomização fornece heterogeneidade entre os grupos em relação ao ciclo estral e permite a incorporação do princípio de redução no número de animais utilizados (KILKENNY et al., 2010) Esta abordagem também incentiva o uso do sexo como uma variável biológica (MCCULLOUGH et al., 2014; CLAYTON, 2016) e contribui para a redução do viés de sexo na pesquisa básica (BEERY, ZUCKER, 2011; CHECK HAYDEN, 2010).

#### 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados comportamentais foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e ao teste de Levene para a determinação da homogeneidade de variância e demonstrados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Após confirmação de distribuição normal dos dados foi realizada a análise de variância (ANOVA) de uma via. Em comparações em que os animais foram re-expostos ao mesmo contexto (A ou B). Os dados obtidos no Contexto A foram analisados separadamente aos dados obtidos no contexto B. A ANOVA de medidas repetidas foi executada seguida do teste de post-hoc de Newman-Keuls e o valor de significância estatística adotado foi de  $P < 0,05$  para determinação das diferenças entre os grupos e / ou testes. Em comparações entre dois grupos independentes sem re-exposição ao mesmo contexto, o teste de “t” de Student foi adotado. Nos experimentos com a sessão de evocação de 10 e 30 min os dados da sessão de evocação foram analisados quanto ao curso temporal durante a sessão a partir de blocos de 2 min. Outra comparação foi realizada entre o primeiro bloco de 2 min da sessão de re-exposição e as sessões de Testes A. Neste trabalho consideramos que não ocorreu reinstalação da memória quando houve diferença entre os grupos no teste seguinte a sessão de reinstalação. As análises foram realizadas através do programa Statistica® (versão 13; StatSoft Inc., EUA) e os valores graficamente representados através do programa GraphPad Prism® (versão 5.0 GraphPadPrism, San Diego, EUA).

## 5 EXPERIMENTOS

---

5.1 Experimento 1: Efeito da fase do ciclo estral sobre a expressão da memória de medo contextual durante a exposição aos contextos pareado e não pareado.

Com o objetivo de investigar se a fase do ciclo estral pode influenciar a expressão da resposta defensiva diante ao contexto pareado e não pareado, 27 ratas foram condicionadas no Contexto A e, posteriormente, alocadas em três grupos independentes (n= 8 - 10 / grupo) de acordo com a fase do ciclo estral no dia da sessão de evocação no Contexto A. Após a sessão de evocação, todos os grupos seguiram a sequência: Teste A1, Teste B1, Teste A2 e Teste B2 , 1, 2, 21 e 22 dias, respectivamente.

5.2 Estudo da duração da sessão de re-exposição como indicadora do desenvolvimento final da memória.

Como descrito previamente, a re-exposição ao ambiente pareado é capaz de promover quatro possíveis desfechos: “mera” reativação, desestabilização, zona insensível ou de “limbo” e a extinção da memória. Neste trabalho, utilizamos o condicionamento aversivo ao contexto e, posteriormente, submetemos as fêmeas a diferentes tempos de re-exposição ao contexto pareado com o objetivo de investigar esses quatro desfechos, caracterizando-os a partir do tempo de re-exposição e a sensibilidade ao efeito amnésico do MDZ ao Contexto A.

5.2.1 Experimento 2: Efeito da administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 1 min sobre a memória aversiva contextual

Com o intuito de determinar se uma sessão de re-exposição de 1 minuto é suficiente para promover a labilização da memória aversiva contextual, 16 ratas (n= 8 / grupo) foram condicionadas no Contexto A e alocadas com base no tratamento sistêmico com VEI ou MDZ 3 mg/Kg i.p. realizado imediatamente após a sessão de re-exposição de 1 minuto. Um e sete dias depois, as ratas foram avaliadas nos Testes A1 e A2, respectivamente.

### 5.3 Experimento 3: Efeito da administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 2 min sobre a memória aversiva contextual

Seguindo um protocolo similar ao do experimento anterior, mas com a inserção da sessão de reinstalação, aumentamos o tempo de re-exposição de 2 min para investigar se este tempo poderia induzir a labilização da memória. Assim, 17 ratas (n= 8 - 9 / grupo) previamente pareadas ao Contexto A receberam 1 única administração de VEI ou MDZ 3 mg/Kg por via i.p. imediatamente após a re-exposição de 2 min no Contexto A, foram testadas 1 e 7 dias depois e submetidas à sessão de reinstalação da memória.

### 5.4 Experimento 4: Efeito da administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 5 min sobre a memória aversiva contextual

De maneira similar ao experimento 3, este experimento foi conduzido com o objetivo de investigar se o aumento da sessão de re-exposição para 5 min ainda seria capaz de promover a desestabilização da memória. Para isso, 20 ratas (n= 10 / grupo) previamente condicionadas receberam 1 única administração de VEI ou MDZ 3 mg/Kg por via i.p. imediatamente após a sessão de evocação de 5 min no Contexto A.

### 5.5 Experimento 5: Efeito da administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 7 min sobre a memória aversiva contextual

Este experimento foi realizado com o intuito de investigar se o aumento da sessão de re-exposição de 7 min também poderia induzir a desestabilização da memória, de maneira semelhante ao experimento anterior, 17 ratas (n= 8 - 9 / grupo) previamente condicionadas receberam 1 única administração de VEI ou MDZ 3 mg/Kg por via i.p. após a sessão de evocação de 5 min no Contexto A e foram testadas e retestadas 1 e 7 dias depois, respectivamente e posteriormente, submetidas à sessão de reinstalação.

### 5.6 Experimento 6: Efeito da administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 10 min sobre a memória aversiva contextual



Realizamos este experimento com a proposta de investigar se uma sessão de re-exposição com duração de 10 min é capaz de promover a labilização da memória. De maneira similar aos experimentos anteriores, 17 ratas (n= 8 - 9 / grupo) previamente condicionadas, foram submetidas à sessão de re-exposição com duração de 10 min no Contexto A e, receberam VEI ou MDZ 3 mg/Kg i.p. Desta vez, as ratas foram testadas diretamente 7 dias depois e, no dia seguinte, submetidas à sessão de reinstalação. Optamos por conduzir o TA1 7 depois, com base nos os experimentos anteriores. Além disso, este estudo é conduzido em fêmeas e, ajustes no delineamento experimental foram realizados para amenizar resultados falso-negativos e /ou positivos.

#### 5.7 Experimento 7: Efeito da administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 30 min s sobre a memória aversiva contextual

Para investigar se o aumento da sessão de re-exposição para 30 min é capaz de promover a desestabilização da memória, 21 ratas (n= 11 - 10 / grupo), de maneira semelhante ao experimento 9, receberam de VEI ou MDZ 3 mg/Kg por via i.p. após a sessão de re-exposição de 30 min. Após 7 dias, as ratas foram testadas e um dia mais tarde, submetidas à sessão de reinstalação.

#### 5.8 Experimento 8: Efeito da administração de MDZ após a sessão de Teste A1 sobre a expressão da memória aversiva contextual

Buscando determinar se após a sessão de Teste A1 o MDZ exerce efeito sobre a expressão de congelamento nos testes subsequentes, 18 ratas (n= 8 – 10 / grupo) passaram pela sessão de evocação de 5 minutos e um dia depois, após o Teste A1, receberam VEI ou MDZ 3 mg/kg por via i.p. e foram novamente testadas 7 dias mais tarde no Teste A2. 1 dia após a sessão de Teste A2 ambos os grupos passaram pela sessão de reinstalação da memória aversiva no Contexto C e no dia seguinte, avaliados diante o Teste A3.

#### 5.9 Experimento 9: Efeito da administração de MDZ sobre a expressão da memória aversiva contextual 6 horas após a sessão de re-exposição.

Este experimento foi conduzido com o objetivo de investigar a possível ocorrência de um período crítico de maleabilidade da memória após a desestabilização. Estimamos que este período pudesse ser inferior a 6 h e, após esse período, a memória foi restabilizada e se encontra na forma estável, e não mais suscetível a modulação. Para isso, de maneira similar ao experimento 4, 19 ratas (n= 9 - 10/grupo) foram submetidas a sessão de re-exposição de 5 min, entretanto, administramos VEI ou MDZ 3 mg/kg i.p. apenas 6 h depois dessa sessão. No dia seguinte, as ratas foram testadas e retestadas 18 horas e 7 dias depois, respectivamente. Posteriormente, as ratas foram submetidas à sessão de reinstalação.

#### 5.10 Experimento 10: Efeito da administração de MDZ na ausência de uma sessão de evocação sobre a expressão da memória aversiva contextual

O presente experimento foi executado com o objetivo de investigar se o MDZ exerce efeito per se sobre o comportamento de congelamento ou apenas sob a memória que foi reativada. Para isso, 19 ratas (n= 9 – 10 / grupo) foram condicionadas ao Contexto A e, no dia seguinte, omitimos a sessão re-exposição. Entretanto, de maneira similar aos demais experimentos, os grupos receberam VEI ou MDZ 3 mg/kg por via i.p. e, um dia mais tarde, foram testados no Contexto A.

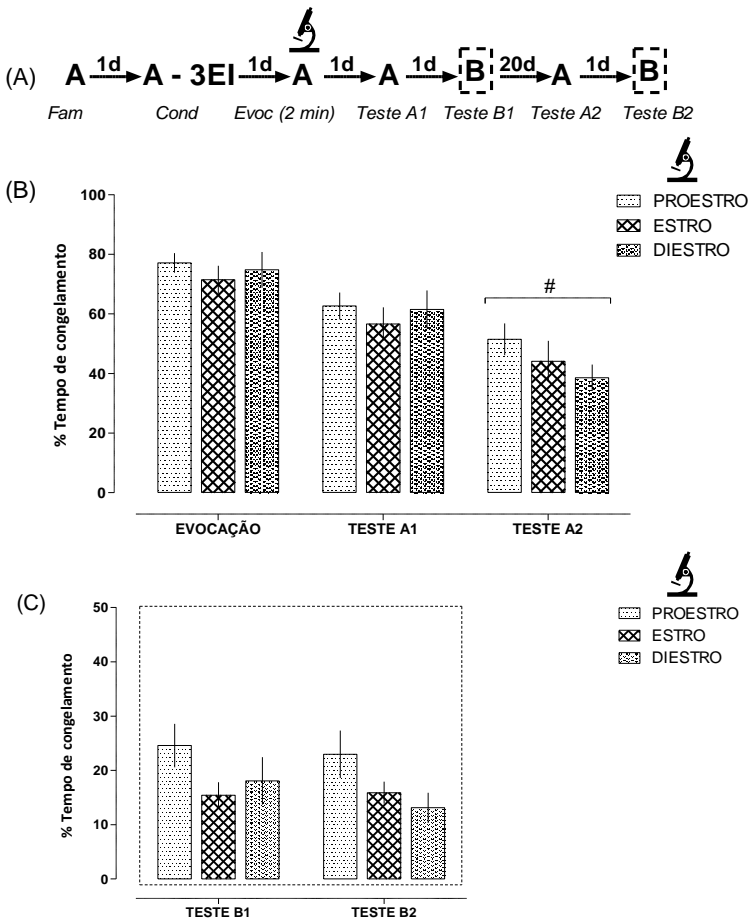
## 6 RESULTADOS

---

6.1 Experimento 1: A fase do ciclo estral verificada no dia da sessão de evocação não influencia na expressão da memória aversiva contextual.

A ANOVA de uma via com medidas repetidas demonstrou que não houve efeito do ciclo estral [ $F_{(2,24)} = 0,59$ ;  $P = 0,55$ ], mas houve efeito da re-exposição ao Contexto A [ $F_{(2,48)} = 25,14$ ;  $P = 0,000001$ ], entretanto, sem interação entre os fatores [ $F_{(4,48)} = 0,84$ ;  $P = 0,50$ ] para o tempo de congelamento durante as exposições ao Contexto A. Quando expostos ao Contexto B, a ANOVA de uma via com medidas repetidas indicou que não ocorreu efeito da fase do ciclo estral [ $F_{(2,24)} = 2,29$ ;  $P = 0,12$ ] ou da re-exposição [ $F_{(1,24)} = 0,99$ ;  $P = 0,32$ ]. Também não ocorreu interação entre os dois fatores [ $F_{(2,24)} = 0,61$ ;  $P = 0,54$ ] diante os níveis de congelamento durante os Testes B1 e B2 (Figura 11).

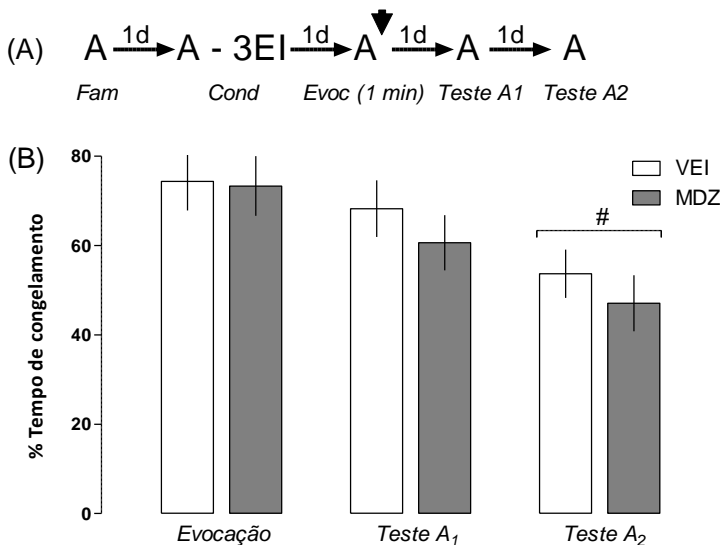
De acordo com a informação estatística relevante observamos que não houve diferença entre as fases do ciclo estral em relação ao contexto A ou B em nenhuma das sessões de teste. Diante as sessões de Teste A2, 21 dias depois, todos os grupos apresentaram redução da porcentagem de congelamento em relação à primeira sessão de re-exposição. Já quando expostos às sessões de Teste B1 e 21 dias mais tarde ao Teste B2, todos os grupos mostraram níveis baixos e similares de congelamento. Os resultados deste experimento sugerem que a fase do ciclo estral no dia da sessão de evocação não influencia na expressão da memória no contexto pareado e não pareado. Esse perfil perdura por pelo menos 21 dias após a primeira sessão de Testes A e B. Visto que a fase do ciclo estral, em nossas condições, não interfere na expressão do congelamento, e esta é a medida de retenção da memória utilizada neste estudo, todos os experimentos subsequentes, foram conduzidos mantendo uma proporção similar de animais em cada um dos grupos em relação ao ciclo estral no dia da sessão de re-exposição. Ainda, os resultados aqui obtidos indicam que a re-exposição ao Contexto A favorece a redução do congelamento. Esse perfil de resposta é compatível com a extinção por exposições repetidas ao Contexto associado, entretanto, essa resposta requer confirmação. Para tal fim, nos demais experimentos, exceto para o experimento 2, utilizamos a sessão de reinstalação como forma de auxiliar na identificação do processo dominante após as re-exposições ao Contexto A.



**Figura 11 – Evidência de que a fase do ciclo estral não interfere na expressão da memória de medo contextual (experimento 1).** (A) Protocolo experimental (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de re-exposição, Teste A1 e Teste A2 e (C) durante os Testes B1 e B2. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento ( $n = 8-10$ /grupo). # indica diferença significativa do mesmo grupo em relação a sessão de evocação.  $\mathcal{E}$  indica o momento da verificação da fase do ciclo estral. Nível de significância adotado ( $P < 0,05$ ). ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Newman – Keuls para comparações no Contexto A e B.

6.2 Experimento 2: Administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 1 min não exerce efeito sobre a expressão da memória aversiva contextual.

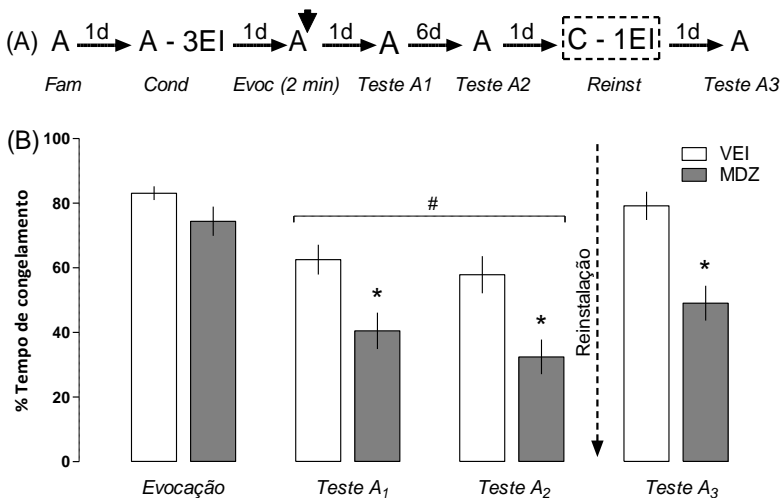
A ANOVA com medidas repetidas demonstrou que houve efeito da re-exposição ao Contexto A [ $F(2, 28) = 10,18$ ;  $P = 0,00049$ ], mas não do tratamento com MDZ [ $F(1, 14) = 0,62$ ;  $P = 0,44$ ] ou interação entre os fatores [ $F(2, 28) = 0,22$ ;  $P = 0,79$ ] para o tempo de congelamento no contexto pareado. Durante a sessão de re-exposição e de Teste A1, ambos os grupos apresentaram níveis de congelamento similares. Não houve diferença deste grupo em relação ao grupo VEI em nenhuma das sessões de Teste. Avaliados de forma global, os dados obtidos sugerem que o MDZ administrado após a sessão de evocação de 1 min não exerce efeito sobre a expressão do congelamento (Figura 12).



**Figura 12 – Sessão de re-exposição de 1 minuto não é suficiente para induzir a labilização da memória (experimento 2).** (A) Protocolo experimental (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de re-exposição, Teste A1 e Teste A2. Os dados são representados com Média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento ( $n = 8$ / grupo VEI:  $P=3$ ;  $E=2$ ;  $D=3$ ; MDZ:  $P=3$ ;  $E=2$ ;  $D=3$ ). # indica uma diferença significativa do mesmo grupo em relação a sessão de evocação.  $\blacktriangledown$  indica o momento da administração do tratamento.

### 6.3 Experimento 3: MDZ administrado após uma sessão de re-exposição de 2 min previne a reinstalação da memória aversiva contextual.

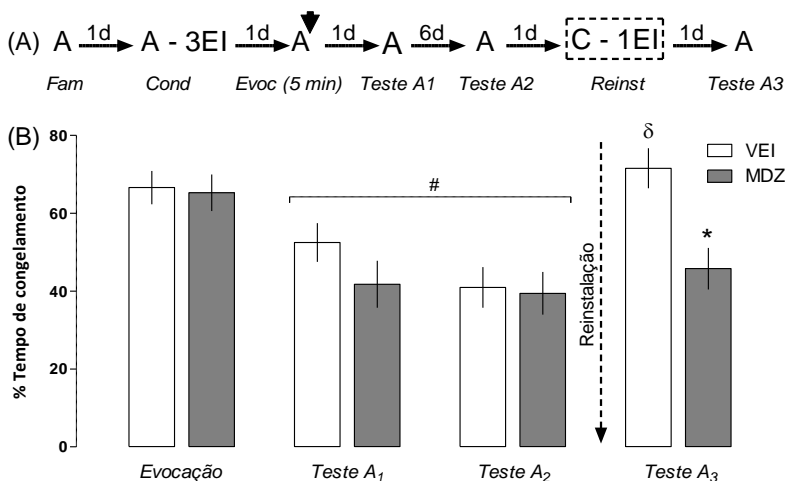
A ANOVA com medidas repetidas apontou interação entre os fatores tratamento e repetição ao Contexto A [ $F_{(3,45)} = 3,58$ ;  $P = 0,02$ ]. O teste de post-hoc de Newman-Keuls revelou que durante o Teste A1 o grupo que recebeu MDZ imediatamente após a evocação apresentou menor tempo de congelamento comparado ao grupo VEI ( $p < 0,05$ ). Este perfil foi mantido 7 dias depois, quando avaliados no Teste A2. Neste teste, o grupo que recebeu MDZ após a primeira sessão de re-exposição manteve o nível de congelamento significativamente inferior ao grupo VEI ( $p < 0,05$ ). O nível de congelamento apresentado pelo grupo veículo é sugestivo de reinstalação da memória aversiva (Figura 13).



**Figura 13 – MDZ prejudica a reconsolidação da memória aversiva contextual após uma sessão de re-exposição de 2 min (experimento 3).** (A) Protocolo experimental (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de re-exposição, Teste A1, A2 e A3. Os dados são representados como Média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento ( $n = 8 - 9$  / grupo VEI:  $P=1$ ;  $E=4$ ;  $D=4$ ; MDZ:  $P=4$ ;  $E=1$ ;  $D=3$ ) \* indica uma diferença significativa em relação ao respectivo controle, # indica uma diferença significativa do mesmo grupo em relação a sessão de evocação, nível de significância adotado ( $P < 0,05$ ). indica o momento da administração do tratamento. ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Newman – Keuls.

#### 6.4 Experimento 4: MDZ administrado após uma sessão de re-exposição de 5 min previne a reinstalação da memória aversiva contextual.

A ANOVA de uma via com medidas repetidas apontou interação entre os fatores [ $F_{(3,54)} = 5,55$ ;  $P = 0,002$ ]. O teste post-hoc de Newman-Keuls mostrou que durante o Teste A1, ambos os grupos apresentaram redução dos níveis de congelamento quando comparados à sessão de evocação, mas não houve diferença significativa entre os grupos neste teste. O mesmo ocorreu 7 dias depois no Teste A2 onde ambos os grupos, MDZ e VEI, mantiveram os níveis de congelamento similares ao Teste A1. Após a sessão de reinstalação no Teste A3, o grupo que recebeu MDZ após a sessão de evocação não apresentou reinstalação da memória de medo, evidenciado por níveis de congelamento inferior ao grupo que recebeu VEI após a sessão de evocação. Estes resultados sugerem que a sessão de re-exposição de 5 min é capaz de promover a reconsolidação da memória. As sucessivas re-exposições ao Contexto A auxiliam na redução do congelamento, entretanto, a ausência de reinstalação do grupo MDZ no Teste A3 indica que o processo de reconsolidação, mas não extinção, ocorreu após a sessão de 5 min (Figura 14).



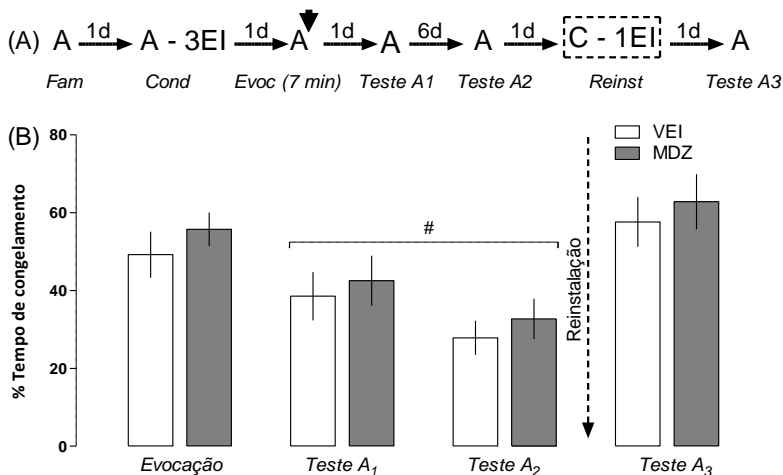
**Figura 14 – MDZ previne a reinstalação da memória aversiva após uma sessão de re-exposição de 5 min (experimento 4).** (A) Protocolo experimental (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de re-exposição, Teste A1, A2 e A3. Os dados são representados com Média  $\pm$  E.P.M.

da porcentagem de congelamento (n = 9 - 10/ grupo VEI: P=3; E=3; D=4; MDZ: P=3; E=4; D=3) \* indica uma diferença significativa em relação ao respectivo controle, # indica uma diferença significativa do mesmo grupo relação a sessão de evocação. Nível de significância adotado ( $P < 0,05$ ) indica o momento da administração do tratamento. ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Newman – Keuls.

6.5 Experimento 5: Administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 7 min não exerce efeito sobre expressão da memória aversiva contextual.

A ANOVA de uma via com medidas repetidas indicou efeito da re-exposição ao Contexto A [ $F_{(3,45)} = 28,18$ ;  $P = 0,00000$ ], mas não do tratamento com MDZ [ $F_{(1,15)} = 0,53$ ;  $P = 0,47$ ] também não ocorreu interação entre os fatores [ $F_{(3,45)} = 0,04$ ;  $P = 0,98$ ]. A informação estatística relevante mostrou que durante o Teste A1, o grupo que recebeu MDZ apresentou redução nos níveis de congelamento quando comparado a sessão de evocação, mas não houve diferença entre os grupos neste teste. Quando expostos ao Teste A2, 7 dias depois, ambos os grupos, MDZ e VEI, apresentaram níveis de congelamento inferiores a sessão de evocação. Depois de submetidos a sessão de reinstalação da memória aversiva e 24 mais tarde avaliadas no Teste A3, ambos os grupos, apresentaram reinstalação da memória, evidenciado por níveis de congelamento superiores ao Teste A2 e níveis similares a sessão de evocação. Em conjunto, estes dados sugerem a sessão de evocação para 7 min promove a redução da expressão de congelamento. Entretanto, confere uma zona insensível ao efeito do MDZ durante os Testes A1 e A2, demarcado ainda pela ausência de efeito sobre a reinstalação quando comparado ao grupo VEI no Teste A3 (Figura 15).



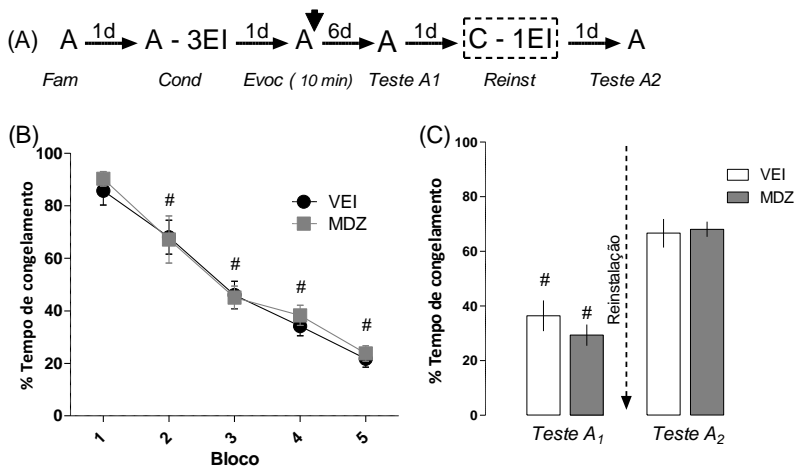


**Figura 15 – MDZ após a sessão de re-exposição de 7 min não exerce efeito sobre a expressão de congelamento (experimento 5).** (A) Protocolo experimental (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de re-exposição, Teste A1, A2 e A3. Os dados são representados com Média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento ( $n = 9 - 10/$  grupo VEI:  $P=3; E=2; D=3$ ; MDZ:  $P=3; E=3; D=2$ ) # indica uma diferença significativa do mesmo grupo em relação a sessão de evocação. Nível de significância adotado ( $P < 0,05$ ). Indica o momento da administração do tratamento. ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Newman – Keuls.

6.6 Experimento 6: Administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 10 min não exerce efeito a sobre a expressão da memória aversiva contextual.

A ANOVA de uma via com medidas repetidas indicou efeito do tempo de exposição ao contexto A [ $F_{(4,60)} = 28,18; P = 0,000001$ ], mas não do tratamento com MDZ [ $F_{(1,15)} = 0,12; P = 0,72$ ] ou interação dos fatores [ $F_{(4,60)} = 0,21; P = 0,92$ ] ao longo da sessão de evocação. Em relação aos Testes A1 e A2, a ANOVA de uma via com medidas repetidas demonstrou efeito da re-exposição [ $F_{(3,45)} = 98,92; P = 0,00001$ ], mas não do tratamento [ $F_{(1,15)} = 0,00006; P = 0,99$ ] ou interação entre os fatores [ $F_{(3,45)} = 0,82; P = 0,48$ ]. A informação estatística relevante revelou que durante o Teste A1 ambos os grupos apresentaram baixos níveis de congelamento quando comparados ao Bloco 1 (2 min) da sessão de

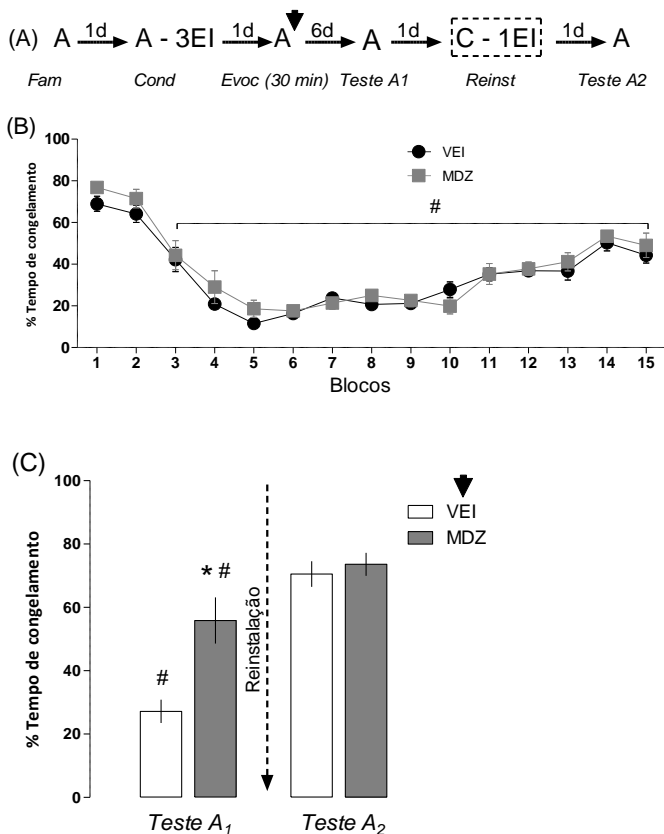
evocação. Após a sessão de reinstalação da memória e durante o Teste A2, ambos os grupos MDZ e VEI apresentaram níveis elevados de congelamento em relação ao Teste A1. Entretanto, não houve diferença entre os grupos em nenhuma das sessões de Testes (A1 ou A2). Avaliados de maneira global, o presente resultado sugere que a sessão de evocação de 10 min promove a redução da expressão de congelamento. Entretanto, esta sessão confere ao MDZ um insensível de ação sobre a memória, demarcado pela ausência de efeito durante os Testes A1 e evidenciado pela reinstalação semelhante ao grupo VEI no Teste A3 (Figura 18).



**Figura 16 – MDZ depois de uma sessão de re-exposição de 10 min não exerce efeito sobre a expressão de congelamento (experimento 6).** (A) Protocolo experimental. (B) Curva temporal da sessão de evocação em blocos de 2 min (C) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de re-exposição, Teste A1 e A2. Os dados são representados com Média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento ( $n = 8 / 9$  grupos. VEI: P=2; E=4; D=2; MDZ: P=3; E=2; D=3). # indica diferença significativa do mesmo grupo em relação a sessão de evocação. Nível de significância adotado ( $P < 0,05$ ). ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Newman – Keuls para comparações entre os blocos da sessão de evocação e re-exposição e no Contexto A.

6.7 Experimento 7: Administração de MDZ após uma sessão de re-exposição de 30 min prejudica a retenção da extinção da memória aversiva contextual.

A ANOVA de uma via com medidas repetidas indicou efeito do tempo de exposição ao contexto A [ $F_{(1,17)} = 48,29$ ;  $P = 0,00000$ ], mas não do tratamento com MDZ [ $F_{(1,17)} = 2,57$ ;  $P = 0,12$ ] ou interação dos fatores [ $F_{(1,17)} = 0,34$ ;  $P = 0,56$ ] durante a sessão de re-exposição. Em relação aos Testes A1 e A2, a ANOVA de uma via com medidas repetidas apontou efeito do tratamento [ $F_{(1,17)} = 7,92$ ;  $P = 0,01$ ], da re-exposição [ $F_{(3,51)} = 33,82$ ;  $P = 0,00000$ ] e interação entre os fatores [ $F_{(3,51)} = 4,73$ ;  $P = 0,005$ ]. O teste de post-hoc de Newman-Keuls revelou que durante o Teste A1 o grupo tratado com MDZ apresentou níveis mais elevados de congelamento em relação ao grupo VEI. Ambos os grupos apresentaram redução dos níveis quando comparados ao 1 bloco (2 min) da sessão de evocação. Após a sessão de reinstalação da memória e durante o Teste A2, ambos os grupos, MDZ e VEI expressaram níveis maiores de congelamento em relação ao Teste A1, mas não houve diferença entre os grupos durante o Teste A3. Avaliados em conjunto, estes resultados indicam que o MDZ prejudica a redução da expressão de congelamento quando administrado após uma longa sessão de re-exposição (Figura 19).

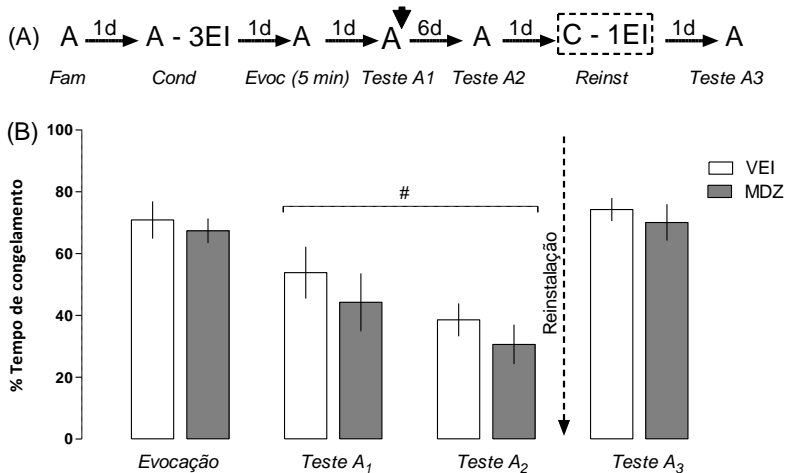


**Figura 17 – MDZ prejudica a consolidação da memória de extinção após uma sessão de re-exposição de 30 min (experimento 7).** (A) Protocolo experimental. (B) Curso temporal da sessão de re-exposição de 30 min em blocos de 2 min. (C) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante o Teste A1 e A2. Os dados são representados com Média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento ( $n = 9 - 10$  / grupo, VEI: P=3; E=3; D=3; MDZ: P=3; E=3; D=4). \* indica uma diferença significativa em relação ao grupo VEI no mesmo teste, # indica diferença do mesmo grupo em relação ao 1 Bloco da re-exposição. Nível de significância adotado ( $P < 0,05$ ). A seta indica o momento da administração do tratamento. ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Newman – Keuls para comparações entre os blocos da sessão de evocação e para o Contexto A.

## 6.8 Experimento 8: Efeito da administração de MDZ após a sessão de Teste A1 sobre a expressão da memória aversiva contextual

Buscando determinar se após a sessão de Teste A1 o MDZ exerce efeito sobre a expressão de congelamento nos testes subsequentes, 18 ratas ( $n = 8 - 10$  / grupo) passaram pela sessão de evocação de 5 minutos e um dia depois, após o Teste A1, receberam VEI ou MDZ 3 mg/kg por via i.p. e foram novamente testadas 7 dias mais tarde no Teste A2. 1 dia após a sessão de Teste A2 ambos os grupos passaram pela sessão de reinstalação da memória aversiva no Contexto C e no dia seguinte, avaliados diante o Teste A3.

A ANOVA de uma via com medidas repetidas indicou efeito da re-exposição ao Contexto A [ $F_{(3,48)} = 51,03$ ;  $P = 0,000001$ ], mas não do tratamento com MDZ [ $F_{(1,16)} = 0,62$ ;  $P = 0,44$ ], também não ocorreu interação entre os fatores [ $F_{(3,48)} = 0,35$ ;  $P = 0,78$ ]. A informação estatística relevante mostrou que, durante o Teste A2, ambos os grupos apresentaram baixo nível de congelamento em relação à sessão de evocação e Teste A1, entretanto não houve diferença entre os grupos neste teste. Após a sessão de reinstalação do medo e avaliação no Teste A3, ambos os grupos apresentaram aumento nos níveis de congelamento em relação ao Teste A2 e níveis similares à sessão de evocação. Avaliados em conjunto, estes resultados sugerem que a sessão de evocação prévia confere à memória um novo período insensível ao MDZ (Figura 20).

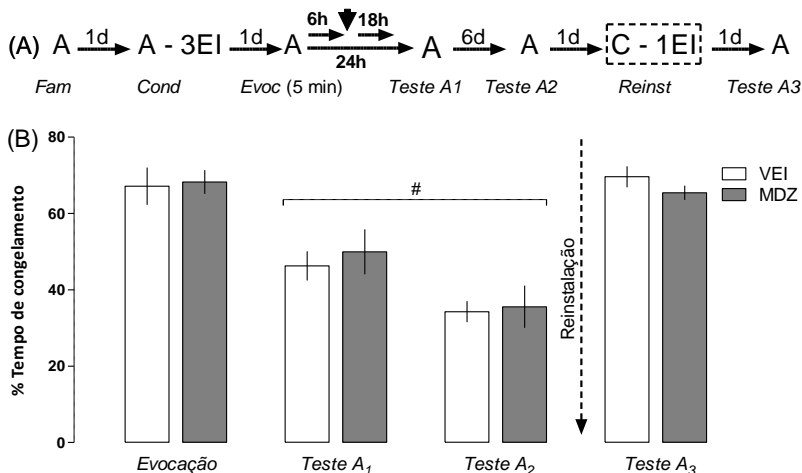


**Figura 18 – MDZ após a sessão de Teste A1 não exerce efeito sobre a expressão da memória aversiva contextual (experimento 10).** (A) Protocolo experimental (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de re-exposição, Teste A1, A2 e A3. Os dados são representados com Média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento ( $n = 8-11$  grupo, VEI: P=4; E=3; D=4; MDZ: P=2; E=3; D=3). # indica uma diferença significativa do mesmo grupo em relação a sessão de evocação.  $\Sigma$  indica uma diferença significativa em relação ao mesmo grupo no teste A1. A seta indica o momento da administração do tratamento. Nível de significância adotado ( $P < 0,05$ ). ANOVA de uma via com medidas repetidas para comparações no Contexto A seguida pelo teste post-hoc de Newman – Keuls.

6.9 Experimento 9: Efeito do MDZ é restrito à janela temporal de 6h após a evocação da memória.

A ANOVA com medidas repetidas mostrou que não houve efeito do tratamento com MDZ [ $F_{(1,17)} = 0,010$ ;  $P = 0,91$ ], mas apontou efeito da re-exposição ao Contexto A [ $F_{(3,51)} = 42,31$ ;  $P = 0,000001$ ], mas não houve interação entre os fatores [ $F_{(3,51)} = 0,49$ ;  $P = 0,68$ ]. A informação estatística relevante mostrou que durante o Teste A1, ambos os grupos apresentaram redução dos níveis de congelamento em relação a sessão de evocação, sem diferença significativa entre os grupos neste teste. De maneira semelhante, também não houve diferença entre os grupos no Teste A2, e ambos os grupos apresentaram redução dos níveis de

congelamento referente tanto à sessão de evocação quanto ao Teste A1. Após serem submetidos à sessão de reinstalação e expostos ao Teste A3 ambos os grupos apresentaram aumento no nível de congelamento quando comparados ao Teste A2. Avaliados em conjunto, estes dados sugerem que o efeito do MDZ sobre a expressão da memória exerce efeito em um espaço temporal inferior a 6 h (Figura 19).

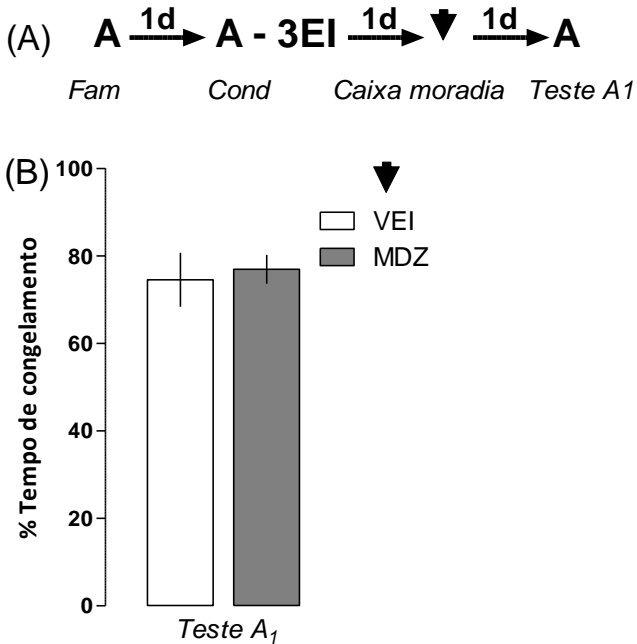


**Figura 19 – Efeito do MDZ após uma re-exposição de 5 min ao Contexto pareado é restrito a janela temporal de 6 horas (experimento 9).** (A) Protocolo experimental (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de re-exposição, Teste A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>. Os dados são representados com Média ± E.P.M. da porcentagem de congelamento (n = 9-10 grupo, VEI: P=3; E=3; D=4; MDZ: P=3; E=3; D=3). # indica uma diferença significativa do mesmo grupo em relação a sessão de evocação. ▼ Indica o momento da administração do tratamento. ANOVA de uma via com medidas repetidas para comparações no Contexto A seguida pelo teste post-hoc de Newman – Keuls.

6.10 Experimento 10: Efeito do MDZ é específico para memórias evocadas.

Conforme demonstra graficamente a figura 20, o teste “t” de Student demonstrou que não houve efeito do tratamento para o Teste A1 ( $t_{14} = 0,73$ ;  $P = 0,7329$ ) quando omitida a sessão de evocação e o MDZ administrado. Através deste resultado, podemos sugerir que o efeito do

MDZ sobre a reconsolidação da memória é específico para memórias que foram evocadas e desestabilizadas.



**Figura 20 – Efeito do MDZ é específico para memórias que foram evocadas (experimento 10).** (A) Protocolo experimental (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de re-exposição, Teste A1. Os dados são representados com Média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento (n = 8-11 grupo, VEI: P=3; E=3; D=2; MDZ: P=3; E=2; D=3). A seta indica o momento da administração do tratamento. Teste de “t” de Student para grupos independentes.



## DISCUSSÃO

---

### 7.1 FÊMEAS E MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL: MEMÓRIA ALÉM DO CICLO ESTRAL.

A fase do ciclo estral no condicionamento aversivo contextual nem sempre é levada em consideração (MAREN et al., 1994; GUPTA et al., 2001). Neste trabalho, demonstramos que a fase do ciclo estral no dia da sessão de evocação não influencia na expressão do congelamento diante do contexto pareado e não pareado. Em linha com esses achados, estudos anteriores demonstram que o ciclo estral não influencia diferencialmente a expressão da RC em uma sessão de teste subsequente (CHANG et al., 2009; DA SILVA et al., 2016). Outros estudos que consideraram o ciclo estral na alocação dos grupos experimentais demonstraram que as fases proestro, ou estro, no dia do treino (KASHEFI e RASHIDY, 2014), ou proestro, estro e diestro no dia da evocação (CHANG et al., 2009; DA SILVA, 2016) não interferem na capacidade de expressão da RC.

Apesar do condicionamento aversivo contextual não sugerir a influência da fase do ciclo estral, outros paradigmas de aprendizado associativo (WARREN e JURASKA, 1997) como condicionamento aversivo ao som (MILAD et al., 2009), de preferência condicionada ao lugar (ROBERTS et al., 1989; RUSSO et al., 2003), condicionamento com estímulo ocular (do inglês, eyeblink conditioning) (WOOD et al., 2001), o condicionamento operante (SFIKAKIS et al., 1978) e o condicionamento apetitivo aversivo (MORALES et al., 2014) relatam o papel do ciclo estral na RC. Por exemplo, quando o paradigma utilizado é o condicionamento aversivo ao som, as fases proestro e metaestro no dia da habituação, extinção ou do teste, não interferem na expressão do congelamento durante a sessão, mas, em contraste com o paradigma do medo contextual, a fase do ciclo no dia da sessão de extinção interfere na retenção da memória no dia seguinte (MILAD et al., 2009). Neste caso específico, as ratas que durante a sessão de extinção estavam em proestro demonstraram melhor retenção da extinção em relação a ratas em metaestro mas ambas as fases foram capazes de adquirir e reter a extinção (MILAD et al., 2009).

Em mamíferos, os hormônios gonadais agem através de efeitos organizacionais e ativacionais sobre o encéfalo e suportam as diferenças entre os sexos desde o início do desenvolvimento até a fase adulta

(BEATTY, 1984; ROSENFELD, 2017). A ovariectomização de fêmeas adultas (OVX, procedimento de retirada dos ovários) ou o bloqueio do estrógeno por contraceptivos hormonais (GRAHAM et al., 2013) não afeta a aquisição da memória aversiva contextual, mas prejudica a sua capacidade de extinção (CHANG et al., 2009; GUPTA et al., 2001). Em ratas OVX, a administração exógena de E2 modula positivamente, ou negativamente, o processamento da memória de acordo com a dose e o momento de administração (BARHA et al., 2010). Os ER são sensíveis a alterações nos níveis de estrógenos, e a OVX praticamente cessa a produção fisiológica de E2 e gera o “*downregulation*” e a dessensibilização dos ER (NAVARRO et al., 2013). No caso da extinção, ratas OVX que recebem o E2 exógeno restabelecem o padrão de extinção de ratas intactas (CHANG et al., 2009; GUPTA et al., 2001). Em conjunto esses dados sugerem que a OVX altera drasticamente a sinalização de E2 e compromete diretamente o processamento da memória em fêmeas.

Avaliados em conjunto com estudos prévios, o resultado obtido suporta a decisão de separar os grupos experimentais dos experimentos subsequentes mantendo a mesma proporção de animais em cada um dos grupos em relação às fases do ciclo estral no dia da sessão de re-exposição (foco deste estudo). Além disso, esta abordagem possibilita considerar o ciclo dos hormônios gonadais que são importantes para o processamento da memória aversiva em fêmeas (BARTH et al., 2015; LEBRON-MILAD e MILAD, 2012).

## 7.2 A DURAÇÃO DA EVOCAÇÃO COMO FATOR DETERMINANTE NA DESESTABILIZAÇÃO DA MEMÓRIA.

A duração da sessão de re-exposição confere um dos principais fatores limitantes para a indução da labilização e posterior reconsolidação da memória (PEDREIRA et al., 2003; SUZUKI et al., 2004). Nos experimentos 2 e 3 demonstramos que o MDZ após 2, mas não 1 min, de re-exposição reduziu a expressão da RC nos testes subsequentes. De acordo com trabalhos prévios (PIÑEYRO et al., 2014; LEE et al., 2008; BUSTOS et al., 2009), sugerimos que a sessão de 1 min não foi suficiente para induzir a desestabilização da memória. Em contraste, o aumento da sessão para 2 min pode ter sido capaz de engatilhar a desestabilização e possibilitou a visualização do efeito do MDZ sobre a RC. O efeito

amnésico do MDZ sobre a memória foi revelado nas sessões de Testes A1 e A2 e também pela ausência da reinstalação da RC no Teste A3.

Apesar do consenso de que uma única e muito breve sessão de re-exposição não seja suficiente para levar a desestabilização da memória (BUSTOS et al., 2006; SUZUKI et al., 2004; não podemos descartar que novas re-exposições com esta mesma duração resulte na labilização da memória. Por exemplo, a administração da clonidina (agonista  $\alpha$ -adrenérgico) após 2 re-exposições, mas não 1 re-exposição, ao contexto não-associado foi capaz de tornar a memória generalizada suscetível à modulação, de tal forma, que a RC durante a re-exposição ao contexto pareado foi reduzida (MARIN, 2017). Sabendo que, em ambos os sexos, o nível da expressão da RC é relacionado à intensidade do EI durante o treino (MAREN et al., 1994), padronizamos a intensidade do EI utilizada neste estudo (Fig. Supl. 1) e selecionamos a intensidade de 1 mA baseada na expressão do congelamento das fêmeas em nossas condições experimentais. Logo, o nível de congelamento dos grupos durante a sessão de re-exposição de 1 min (~75%) não caracteriza a ausência ou um baixo nível de retenção do aprendizado, sugerindo que a ausência do efeito do MDZ observado não seja atribuída a esta variável.

Estudos anteriores ao nosso trabalho, demonstraram que doses de 1 até 3 mg/kg são efetivas no prejuízo de reconsolidação da memória, considerando fatores como a idade da memória (BUSTOS et al., 2009) e situações onde a desestabilização de fato ocorreu (BUSTOS et al., 2006; ALFEI et al., 2015; PIÑEYRO et al., 2014). A dose utilizada neste estudo é de 3 mg/kg i.p, e o resultado obtido após a re-exposição de 1 min é semelhante ao estudo de Bustos et al., (2009) onde o MDZ também não foi capaz de exercer efeito sobre a expressão do congelamento após 1 min de re-exposição. Nesse mesmo estudo, o aumento da sessão de re-exposição para 3 min possibilitou ao MDZ efeito amnésico. Em nossas condições, o aumento da re-exposição para 2 min evidenciou o efeito do MDZ 24 h depois e persistiu por pelo menos 7 dias, além de ter sido verificado a ausência da reinstalação da RC. Esse padrão de resultados é associado com o prejuízo de reconsolidação da memória (DUVARCI e NADER, 2004).

Em sequência, hipotetizamos que o aumento na sessão de re-exposição poderia continuar favorecendo o processo de desestabilização (experimento 4) (BUSTOS et al., 2009; SUZUKI et al., 2004). Desta forma, aumentamos o tempo de re-exposição para 5 min e, em seguida, administramos o MDZ. De maneira semelhante ao resultado obtido na

sessão de 2 min, e de acordo ao hipotetizado, o MDZ prejudicou a reconsolidação da memória e esse efeito foi evidenciado através da ausência de reinstalação da memória. Um estudo prévio realizado por Da Silva et al., (2016), demonstrou em fêmeas que a re-exposição de 3 min tornou a memória suscetível a modulação farmacológica, em contraste com o presente resultado, nesse estudo não foi verificado o perfil de redução da RC nos grupos controles, e a redução se fez presente apenas no grupo tratado (DA SILVA et al., 2016).

O estudo da reconsolidação da memória aversiva contextual é majoritariamente conduzido em roedores machos. Neste cenário, sessões de re-exposições de 2 min também são empregadas para promover a desestabilização (ALFEI et al., 2015). Entretanto, em machos os tempos mais comumente utilizados variam entre 3 e 10 min (ALFEI et al., 2015; BUSTOS et al, 2010; SUZUKI et al., 2004) e a caracterização da reconsolidação ao longo da sessão re-exposição só foi conduzida neste sexo, tanto no condicionamento contextual (CASSINI et al., 2017; SUZUKI et al., 2004) quanto no condicionamento ao som (MERLO et al., 2014). O presente estudo é o primeiro a caracterizar a reconsolidação da memória aversiva contextual variando o tempo de re-exposição ao EC em fêmeas. Os resultados obtidos aqui em comparação com a literatura em machos, associada à diferença já estabelecida na expressão da RC entre os sexos (MAREN et al., 1994), sugere que o aumento da sessão de re-exposição para 5 min além de promover a reconsolidação da memória favorece a redução da RC em testes subsequentes.

Outro fator que deve ser considerado na avaliação comportamental é a adoção de outras estratégias que refletem a expressão do comportamento (ARCHER, 1975; SHANSKY, 2018). Roedores adotam várias estratégias para responder a estímulos aversivos e o congelamento é uma delas. Usualmente, parâmetros de alto e baixo congelamento são indicativos de retenção do aprendizado (JONES e MONFILS, 2016). Entretanto, não necessariamente o perfil de redução na expressão da RC pelas fêmeas reflete a um déficit no aprendizado. O padrão de resposta dos grupos VEI sugere que a expressão da RC é reduzida pela re-exposição ao contexto associado, e o aumento da sessão, favorece ainda mais essa queda. Esse perfil de resposta é compatível com estudos prévios em fêmeas, onde foi verificado que a re-exposição não reforçada ao EC favorece a redução da RC em fêmeas, e que esse perfil além de ser superior ao perfil dos machos, é modulado pelos estrógenos (CHANG et al., 2009, GUPTA et al., 2001). De forma geral, a redução da

RC pode ser atribuída a fatores temporais, ligados à persistência ou ao esquecimento do aprendizado (ECKEL-MAHAN et al., 2008; BEKINSCHTEIN et al., 2007; TORREGROSSA e TAYLOR, 2013). Entretanto, em nossas condições experimentais, demonstramos que a redução do congelamento não é atribuída a fatores temporais entre a sessão de treino e de re-exposição, o que caracterizaria um possível esquecimento. Mas sim, que a redução da RC nas fêmeas é atribuída ao número de re-exposições executadas (Fig. Supl. 2).

A redução rápida do congelamento observada nas fêmeas pode retratar a adoção de uma estratégia de enfrentamento diferente da estratégia de escolha pelos machos quanto confrontadas no EC. Por exemplo, em roedores é bem estabelecido que machos e fêmeas diferem na expressão de comportamentos relacionados ao estresse (DALLA e SHORS, 2009; SHANSKY, 2018). Fêmeas tendem a expressar respostas defensivas de maneira mais ativa, e executam mais situações de escape ou exploração, enquanto machos tendem a expressar respostas defensivas ficando imóveis (ARCHER, 1975). Um trabalho recente executado por Gruene et al., (2015) demonstrou que ambos os sexos durante condicionamento expressam o comportamento de “darting” (execução de movimentos rápidos de deslocamento horizontal após administração de um som). Entretanto, a frequência de “darts” é maior em fêmeas do que em machos, e esta característica foi relacionada com a melhor retenção da extinção em fêmeas e não demonstrou ter influência do ciclo estral. Ainda, a idade dos animais utilizados durante o estudo também pode ter favorecido a extinção nas fêmeas. Foi demonstrado que, no teste do labirinto em cruz elevado, fêmeas entre 60 e 120 dias de idade entram mais vezes e permanecem mais tempo nos braços abertos do que machos nesta mesma faixa de idade (IMHOF et al., 1993).

Para a nossa caracterização da reconsolidação da memória aversiva contextual em fêmeas, padronizamos (Fig. Supl. 3) e adotamos a sessão de reinstalação da memória para evitar conclusões equivocadas. De acordo com os resultados encontrados, fica clara a necessidade de ajuste dos protocolos experimentais envolvendo fêmeas e memória aversiva contextual. Em nossas condições, a execução da sessão de reinstalação, foi crucial para confirmar a reconsolidação em fêmeas. Assim, a partir dos dados obtidos, sugerimos que a análise isolada das sessões de Testes A1 e A2 é limitada e pode conduzir a interpretação de um resultado falso-negativo. Portanto, a adoção do Teste de reinstalação

da RC, foi capaz de fornecer o esclarecimento sobre o processo dominante após a sessão de re-exposição.

A neurotransmissão GABAérgica também é associada a extinção da memória (MAKKAR et al., 2010). Não podemos ignorar que o resultado obtido com o MDZ sobre a RC seja atribuído a de facilitação da extinção. A característica marcante da extinção da memória é o retorno do medo (BOUTON, 2002), entretanto este perfil não foi verificado nos grupos que receberam MDZ em relação aos respectivos controles após a reinstalação a memória. O resultado obtido suporta os achados de outros estudos que também demonstram ausência da reinstalação após o prejuízo da reconsolidação em machos utilizando uma dose inferior de MDZ (1 mg/kg i.p) (BUSTOS et al., 2006), CBD (STERN et al., 2012), inibidores de síntese proteica (DUVARCI e NADER, 2004) ou um estímulo distrator durante a re-exposição (CRESTANI et al., 2015). Ainda, de acordo com a teoria do traço dominante (DEBIEC et al., 2002; EISENBERG et al., 2003), breves sessões de re-exposição, como a de 2 e 5 min aqui executadas, não seriam suficientes para conduzir o traço de memória para a extinção. Neste caso, se o MDZ tivesse agido sobre a extinção, a resposta visualizada seria o oposto do obtido, ou seja, o obtido seria a manutenção ou o nível de RC elevado em relação ao grupo VEI, pelo prejuízo da consolidação da extinção (BUSTOS et al., 2009; MYERS e DAVIS, 2002).

O efeito do MDZ em reduzir a RC poderia ser atribuído a efeitos não dependentes do processo de reconsolidação (CAHILL et al., 2001; GISQUET-VERRIER e RICCIO, 2012). Para verificarmos se o efeito do MDZ visualizado nos experimentos anteriores poderia ser relacionado a efeitos sensibilizadores ou secundários do MDZ per se e se a intervenção farmacológica requer um período limitado para o efeito sobre a memória, conduzimos o experimento 9. Nos experimentos em que o MDZ exerceu efeito de prejuízo da reconsolidação, o momento da injeção foi imediatamente após a sessão de re-exposição. O efeito de intervenções farmacológicas ou comportamentais é geralmente executado dentro de uma janela temporal de cerca 6h após a evocação da memória (FLAVELL et al., 2011; NADER et al., 2000; PIÑEYRO et al., 2014). Em concordância com esses estudos, demonstramos que a administração do MDZ imediatamente após a sessão de evocação, mas não após 6h, exerceu efeito sobre a expressão da RC. Esse resultado suporta as evidências prévias, onde a ativação de vias responsáveis para manter a memória lábil permanecem nessa conformação por um período de tempo

limitado. Logo, após o período de 6h adotado neste estudo, sugerimos que os mecanismos que suportam a restabilização do traço, como a síntese de proteínas (NADER et al., 2000), o aumento na proporção de receptores NMDA contendo GluN<sub>2</sub>A (MILTON et al., 2013) e a translocação de receptores AMPA (RAO-RUIZ et al., 2011; JAROME et al., 2012) foram concluídos ao longo das 6 h. Dessa forma, o aumento da neurotransmissão GABAérgica promovido pela administração do MDZ, não prejudicou a restabilização das vias envolvidas e nenhum efeito sobre a RC foi detectado. Estes achados reforçam a importância do período crítico de labilização após a evocação e intervenções farmacológicas são efetivas sobre a RC apenas dentro dessa janela temporal.

Mesmo um ambiente não associado pode conduzir este fenômeno, caso seja capaz de induzir um estado interno e/ou de expectativa temporal no animal semelhante às condições estabelecidas no pareamento (ATON et al., 2013; MARIN, 2017). No experimento 10 optamos por ocultar a sessão de reativação e não expomos as ratas a nenhum contexto. O resultado encontrado demonstrou que o MDZ administrado na ausência da sessão de re-exposição não exerceu efeito sobre a expressão da RC. Assim, em concordância com trabalhos anteriores (SARA, 2000; BUSTOS et al., 2006; STERN et al., 2012), a ausência da evocação não fornece a possibilidade da modulação farmacológica sobre o traço de memória, indicando que o MDZ não exerce efeito *per se* sobre a RC.

### 7.3 ENTRE A RECONSOLIDAÇÃO E A EXTINÇÃO: UMA TÊNUE LINHA TEMPORAL?

Tem sido demonstrado que o aumento da duração da sessão de re-exposição conduz a memória para o processo dominante de extinção (SUZUKI et al., 2004). Há evidência de que a transição do processo de reconsolidação para a extinção é separada por um período transitório e insensível ao efeito de drogas, chamado de zona cinza ou de “limbo” (ALFEI et al., 2015; MERLO et al., 2014; FLAVELL e LEE, 2013).

Nos experimentos 5 e 6, demonstramos que o MDZ administrado após uma sessão de re-exposição de 7 ou 10 min, não exerceu efeito sobre a expressão da memória. De acordo com trabalhos prévios, nossos resultados sugerem que após esses tempos de reativação,

a memória se encontra no período de “limbo” e transitoriamente insensível a modulação farmacológica.

Este é o primeiro trabalho que caracteriza a passagem da memória aversiva contextual da reconsolidação para a extinção em fêmeas, e também, é a primeira vez que se estabelece o período de “limbo” neste sexo. Um estudo anterior, conduzido com a mesma droga e via de administração (MDZ 3 mg/kg i.p) também relatou um período transicional insensível ao efeito do MDZ sobre a expressão da memória em machos (ALFEI et al., 2015).

A detecção do período de “limbo” parece não ser vinculada apenas a memórias aversivas contextuais. Estudos em machos que utilizaram outras abordagens farmacológicas, como o MK-801 (antagonista de receptores NMDA), em memórias aversivas contextuais (CASSINI et al., 2017; MERLO et al., 2014), auditivas (ALFEI et al., 2015; SUZUKI et al., 2004) ou em memórias apetitivas (LEE e FLAVELL, 2014) também evidenciaram a existência do período insensível. Estes achados suportam a evidência de que o período de “limbo” não é restrito a um paradigma ou droga, mas sim, que esta fase separa os processos de reconsolidação e extinção.

Ainda assim, diferenças individuais ou de subpopulações levantam questionamentos acerca do período insensível. Entretanto, a análise estatística refinada executada por Cassini et al., (2017) demonstrou que a ausência da ação de drogas sobre a memória neste ponto não é atribuída à subpopulações de animais responsivos e /ou não-responsivos. Esse achado reforça ainda mais a real existência deste período transitório.

As discussões acerca da zona cinza são recentes, porém intrigantes. A teoria de que neste ponto os traços de reconsolidação e extinção competem entre si, e desta forma, não há um traço dominante tem sido apontada como uma das possíveis explicações (MERLO et al., 2014, 2018; ALFEI et al., 2015). O reflexo comportamental que circunda o limbo é sugestivo de que do ponto de vista neuronal, alterações celulares e moleculares sustentem esse efeito. Por exemplo, a fosfatase CaN (apontada como marcador no processo de extinção), não está alterada no período inicial do limbo, entretanto, ao longo do tempo, os níveis de CaN se tornam elevados, caracterizando o período mais tardio do limbo (MERLO et al., 2014). A distinção entre o período inicial e tardio, foi evidenciada pela D-cicloserina (agonista parcial de receptores NMDA)



que na fase tardia foi capaz de antecipar o aumento de CaN e a redução do congelamento, sugerindo que o processo dominante nesta fase é o de extinção. Por outro lado, durante a fase inicial a inefetividade da D-cicloserina em reduzir a RC, aponta para a reconsolidação como processo dominante (MERLO et al., 2014).

Neste estudo, as sessões de 7 e 10 min, mesmo na ausência do efeito do MDZ, foram capazes de conduzir a redução da expressão e também a sua retenção. Entretanto, ambas as sessões apresentaram reinstalação da RC. Estes resultados apontam para mecanismos dissociados envolvendo a redução da expressão do congelamento e a indução de vias moleculares necessárias para extinção dependente de receptores GABA-A. Como já discutido, fêmeas apresentam redução da expressão do congelamento pronunciada fisiologicamente (GUPTA et al., 2001), e talvez, após 7 ou 10 min o sistema GABAérgico ainda não tenha assumido papel crucial em desencadear as vias moleculares necessárias para induzir a extinção, como a síntese de proteínas, aumento nos níveis de CaN ou pERK (MERLO et al., 2014, 2018; PEDREIRA, MALDONADO, 2003; SANTINI et al., 2004).

Analisando os dados obtidos de ponto de vista adaptativo, sugerimos que o período insensível a intervenções farmacológicas é necessário para manter a integridade do indivíduo. De acordo com a teoria proposta por Merlo et al., (2014), neste ponto, há a competição entre os traços de reconsolidação e extinção e nenhum dos dois é dominante. Logo, nesta situação, o animal pode se encontrar em conflito e nessa situação de “avaliação do ambiente”, o enfraquecimento sináptico aumenta o risco de inibir vias necessárias para a finalização do processo dominante. Inibindo estas vias, a chance de enfraquecer a memória original em uma situação em que o encéfalo não finalizou o julgamento do ambiente pode conduzir a decisão menos adequada quando o animal retorna aquele ambiente. Entretanto, a expressão do congelamento e a indução da desestabilização são processos dissociáveis (BARREIRO et al., 2013; LEE e FLAVELL, 2014; MILTON et al., 2013), e desta forma, a hipótese sugerida não explica a redução na expressão do congelamento, limitando-se apenas a explicar a ausência do efeito farmacológico.

Os resultados obtidos neste estudo reforçam as evidências experimentais obtidas nos estudos de Merlo et al., (2014, 2018). Em concordância com este autor, a afirmação da existência do estado do limbo não descarta a possibilidade de que esse período possa ser um terceiro processo mnêmico, agora, inserido entre a reconsolidação e a

extinção. Contudo, ainda é necessária a investigação mais detalhada do limbo através de experimentos comportamentais, moleculares e farmacológicas pode esclarecer essa premissa.

#### 7.4 LONGA SESSÃO OU POR REPETIÇÃO: O CASO DA EXTINÇÃO CONTEXTUAL EM FÊMEAS

Atualmente, uma quantidade significativa de evidência no condicionamento de medo contextual aponta que a re-exposição prolongada ou sucessiva ao EC conduzem o traço de memória para a extinção (SUZUKI et al., 2004; BITENCOURT et al., 2008; DO MONTE et al., 2013). Estudos prévios demonstraram que a administração de drogas amnéticas após uma longa sessão de re-exposição prejudica a consolidação da extinção em machos (ALFEI et al., 2015; BUSTOS et al., 2009; CASSINI et al., 2017). No presente estudo, demonstramos que ambas as sessões, 10 e 30 min (experimentos 9 e 10, respectivamente), foram capazes de promover uma redução da expressão da resposta defensiva, mas que o MDZ prejudicou a retenção da extinção somente após a sessão de 30, sugerindo uma dissociação entre a expressão da resposta defensiva e o processo plástico predominante.

Como discutido anteriormente, uma das possibilidades de explicação sobre a ausência de efeito do MDZ após uma re-exposição de 10 min é que esse tempo conduziria a memória para o período de “limbo”. Entretanto, vários fatores nos levam a sugerir que nesse ponto, o processo da extinção pode ter ocorrido: (1) o nível de congelamento obtido no primeiro e no último bloco da sessão foi significativamente diferente, presumindo que a sessão foi eficaz em conduzir a aquisição da extinção, (2) a extinção bem-sucedida foi confirmada por um baixo nível de resposta no teste de retenção, e (3) foi observada a reinstalação da RC após a apresentação de um EI. Os três fatores mencionados ocorreram de maneira similar em ambos os grupos VEI e MDZ. Logo, sugerimos que a extinção, de fato, ocorreu após a re-exposição de 10 min, contudo, a diminuição da RC não dependente essencialmente da modulação GABAérgica, o que estaria resultando em um aparente período insensível ou de “limbo”. Estudos apontam que a neurotransmissão GABAérgica é importante para a extinção da memória (HARRIS e WESTBROOK, 1998). Em fêmeas, a potencialização da neurotransmissão GABAérgica no HPC pode ocorrer através do “up regulation de receptores” GABA-A via estrógenos (MAGGI e PEREZ, 1986; PEREZ et al., 1986) ou pelo

aumento da ALLO (MAJEWSKA et al., 1986). Visto que, em roedores a expressão da RC é modulada pela atividade das ITCs e que em fêmeas essa atividade pode ser aumentada, sugerimos que esse mecanismo pode ter auxiliado no processamento de pistas contextuais, e conseqüentemente, acelerado a redução da expressão da RC, tanto em longas sessões de re-exposição, quanto pela repetição ao EC.

De acordo com esse corpo de evidências, sugerimos que a neurotransmissão GABAérgica não é crítica em tempos de re-exposição intermediários de re-exposição. Já o perfil de resposta visualizado em nossos dados, sugere que a redução da RC nessas condições, pode ter sido coordenada em parte pelas particularidades do processamento de tarefas hipocampo-dependentes em fêmeas (MAREN et al., 1994). Machos e fêmeas demonstram dimorfismo em regiões relacionadas com o processamento da memória aversiva, como o CPF, HPC e amígdala (LEBRON-MILAD et al., 2012). Diferenças no comportamento em tarefas com componente aversivo são bem reportadas entre os sexos (DALLA e SHORS, 2009). Aqui, utilizamos o condicionamento aversivo ao contexto que também apresenta diferença na expressão da RC entre os sexos (MAREN et al., 1994; GUPTA et al., 2001). Apesar de não compararmos diretamente machos e fêmeas, observamos que fêmeas, após repetidas re-exposições ao EC (sequência de Testes A) ou através da re-exposição de 10 min, independentemente da fase do ciclo estral (Fig. 11, e Supl. 4, respectivamente) apresentam redução da RC. Esses achados concordam com estudos prévios onde também foi identificado este padrão de resposta (GUPTA et al., 2001; CHANG et al., 2009).

No presente estudo, verificamos que re-exposições sucessivas ao EC (através das diferentes sessões de Teste A) proporcionaram a redução da RC em fêmeas. Esse resultado é semelhante ao perfil de resposta obtido por outros grupos de pesquisa, onde também foi verificado que repetidas re-exposições ao EC reduziram a expressão do congelamento em ratas (CHANG et al., 2009; GUPTA et al., 2001), entretanto, em contraste com o estudo de Chang et al., (2009), não verificamos diferença na extinção por repetição entre as fases do ciclo estral (Fig. 11). Quando o MDZ foi administrado após a segunda sessão de re-exposição (experimento 10), não foi observado um prejuízo na memória de extinção. Além disso, visto que a memória original não foi prejudicada, esse tratamento também não exerceu efeito sobre a reconsolidação da memória, ao contrário do que aconteceu quando o MDZ foi injetado após a primeira re-exposição de 5 min. Portanto, nosso

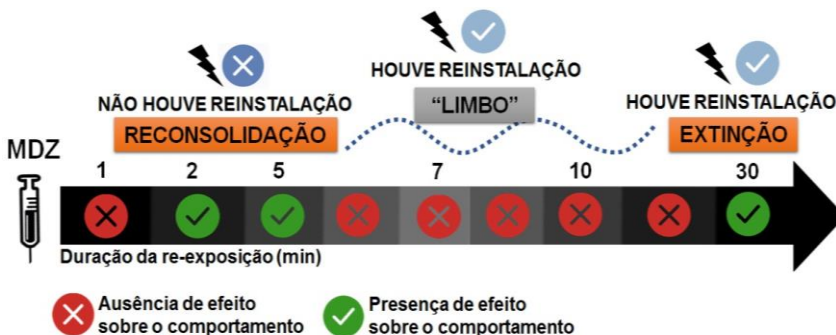
conjunto de resultados nos levou a sugerir que a exposição prévia poderia mudar o padrão temporal da transição de reconsolidação para extinção. Igualmente, somos cientes de que experimentos adicionais são necessários para esclarecer essa possibilidade.

## 8 CONCLUSÕES

---

Neste estudo, demonstramos pela primeira vez em fêmeas, que a passagem da reconsolidação para a extinção da memória aversiva contextual é separada por um período de “limbo” ou insensível a interferências farmacológicas amnésicas. Quando a sessão de re-exposição é muito curta, como a sessão de 1 min, a labilização não é desencadeada e não houve efeito do midazolam (MDZ) sobre a memória. O aumento da sessão de re-exposição para 2 ou 5 min promove a labilização da memória e o MDZ é capaz de prejudicar a reconsolidação da memória, confirmado pela ausência de reinstalação nesse grupo (representado graficamente no lado esquerdo da figura 21). Entretanto, a re-exposição ao contexto por tempo intermediário, como 7 ou 10 min, direciona a memória para o período de “limbo” onde não há um processo dominante. Esse período é demarcado pela ausência do efeito amnésico do MDZ (representado no centro da figura 21). Uma longa re-exposição, como a de 30 min, direciona a memória para o processo de extinção, este, novamente sensível ao efeito amnésico do MDZ. Neste caso, a memória apresenta o prejuízo na consolidação da extinção e, o contrário da reconsolidação, a memória sofre a reinstalação (representado no lado esquerdo da figura 21)

Portanto, demonstramos que a memória aversiva contextual em fêmeas segue um curso temporal particular. Esse curso temporal evidencia que a passagem da reconsolidação para a extinção da memória nesse sexo é demarcada pela dissociação entre a vulnerabilidade ao MDZ e a expressão da resposta defensiva condicionada.



**Figura 21: Representação gráfica do resumo de resultados deste estudo.**

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### Limitações e perspectivas do estudo

Neste estudo avaliamos apenas o nível de congelamento como RC e medida de retenção da memória. Entretanto, como discutido nas sessões anteriores, a avaliação de apenas uma resposta defensiva pode ser limitada e não refletir de fato ao estado interno do animal e direcionar apenas a uma expressão reduzida. Neste estudo, não descartamos a influência dos hormônios que caracterizam as fêmeas, como os estrógenos e progestágenos na modulação dos processos mnemônicos aqui abordados. Apesar de em alguns experimentos analisarmos o ciclo estral como uma variável, esta manobra não designa exatamente o atual status hormonal. A verificação óptica da fase do ciclo estral reflete a alterações que hormonais que já ocorreram e estimularam a diferenciação das células. A real certificação de que os hormônios podem ou não ser indicadores da ausência de um determinado processo apenas pode ser confirmada por exames bioquímicos.

Em relação aos protocolos utilizados neste estudo, temos alguns pontos críticos: (1) a avaliação da reconsolidação até o primeiro resultado de zona insensível teve a sessão de teste 1 dia depois. (2) os protocolos voltados à extinção, a sessão de teste (retenção), foi executada 7 dias após a sessão de extinção. Esta conduta foi adotada partindo de experimentos pilotos de padronização do protocolo. Entretanto não excluímos a possibilidade de fatores temporais interferirem na modulação dos processos verificados. (3) manipulações inibindo a expressão da memória

seguida da administração de agentes amnésicos (4) uso de outras ferramentas farmacológicas envolvendo outros sistemas de neurotransmissão (5) este trabalho teve como objetivo investigar os processos de extinção e de reconsolidação e a real confirmação da ocorrência destes necessita também de análise de mecanismos e marcadores envolvidos na reconsolidação (expressão de zif-268), labilização (alteração de trafficking de subunidades de AMPA e NMDA, atividade de proteassoma), e extinção (CaN) (6) a verificação de marcadores e vias que possam explicar a ausência do efeito farmacológico de drogas durante o limbo. Ainda, as manipulações aqui abordadas precisariam ser conduzidas em outros tipos de condicionamento e não apenas o aversivo, utilizando outras drogas para confirmar que os resultados obtidos não apenas atribuídos ao MDZ.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AIKINS, Deane. Using Propranolol to Block Memory Reconsolidation in Female Veterans with PTSD. Wayne State University Detroit United States, 2015.

ALBERINI, Cristina M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? Trends in neurosciences, v. 28, n. 1, p. 51-56, 2005.

ALBERINI, Cristina M. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. Physiological reviews, v. 89, n. 1, p. 121-145, 2009.

ALBERINI, Cristina M. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. Frontiers in behavioral neuroscience, v. 5, 2011.

ALBERINI, Cristina M.; LEDOUX, Joseph E. Memory reconsolidation. Current Biology, v. 23, n. 17, p. R746-R750, 2013.

ALBERINI, Cristina M.; KANDEL, Eric R. The regulation of transcription in memory consolidation. Cold Spring Harbor perspectives in biology, v. 7, n. 1, p. a021741, 2015.

ALFEI, Joaquín M. et al. Prediction error and trace dominance determine the fate of fear memories after post-training manipulations. *Learning & Memory*, v. 22, n. 8, p. 385-400, 2015.

ARCHER, John. Rodent sex differences in emotional and related behavior. *Behavioral biology*, v. 14, n. 4, p. 451-479, 1975.

ATON, Sara J. Set and setting: how behavioral state regulates sensory function and plasticity. *Neurobiology of learning and memory*, v. 106, p. 1-10, 2013.

BANGASSER, Debra. Sex Differences: To freeze or not to freeze. *eLife*, v. 4, p. e13119, 2015.

BANGASSER, Debra A.; VALENTINO, Rita J. Sex differences in stress-related psychiatric disorders: neurobiological perspectives. *Frontiers in neuroendocrinology*, v. 35, n. 3, p. 303-319, 2014.

BARKER, Jennifer M.; GALEA, Liisa AM. Males show stronger contextual fear conditioning than females after context pre-exposure. *Physiology & behavior*, v. 99, n. 1, p. 82-90, 2010.

BARREIRO, Karina A. et al. Memory expression is independent of memory labilization/reconsolidation. *Neurobiology of learning and memory*, v. 106, p. 283-291, 2013.

BARTH, Claudia; VILLRINGER, Arno; SACHER, Julia. Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. *Frontiers in neuroscience*, v. 9, p. 37, 2015.

BEATTY, William W. Hormonal organization of sex differences in play fighting and spatial behavior. In: *Progress in brain research*. Elsevier, 1984. p. 315-330.

BEERY, Annaliese K.; ZUCKER, Irving. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 35, n. 3, p. 565-572, 2011.

BELELLI, Delia; LAMBERT, Jeremy J. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABAA receptor. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 6, n. 7, p. 565-575, 2005.

BEKINSCHTEIN, Pedro et al. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis-and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, v. 53, n. 2, p. 261-277, 2007.

BITENCOURT, Rafael M.; PAMPLONA, Fabrício A.; TAKAHASHI, Reinaldo N. Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *European Neuropsychopharmacology*, v. 18, n. 12, p. 849-859, 2008.

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

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

BOUTON, Mark E. Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychological bulletin*, v. 114, n. 1, p. 80, 1993.

BOUTON, Mark E.; RICKER, Sean T. Renewal of extinguished responding in a second context. *Learning & behavior*, v. 22, n. 3, p. 317-324, 1994.

BOUTON, Mark E.; BOLLES, Robert C. Role of conditioned contextual stimuli in reinstatement of extinguished fear. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, v. 5, n. 4, p. 368, 1979.

BOUTON, Mark E. et.,al. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biological psychiatry*, v. 60, n. 4, p. 352-360, 2006.

BOUTON, Mark E. Context and retrieval in extinction and in other examples of interference in simple associative learning. 1991.

BOUTON, Mark E. Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biological psychiatry*, v. 52, n. 10, p. 976-986, 2002.



BROOKS, Claudette Elise; CLAYTON, Janine Austin. Sex/gender influences on the nervous system: Basic steps toward clinical progress. *Journal of neuroscience research*, v. 95, n. 1-2, p. 14-16, 2017.

BURGOS-ROBLES, Anthony et al. Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron*, v. 53, n. 6, p. 871-880, 2007.

BUSTOS, S. G. et al. Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-reactivation D-cycloserine administration. *Neuropsychopharmacology*, v. 35, n. 5, p. 1097-1108, 2010.

BUSTOS, S. G.; MALDONADO, H.; MOLINA, V. A. Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. *Neuroscience*, v. 139, n. 3, p. 831-842, 2006.

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

BUTCHER, R. L.; COLLINS, W. E.; FUGO, N. W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, v. 94, n. 6, p. 1704-1708, 1974.

CASSINI, Lindsey F. et al. On the transition from reconsolidation to extinction of contextual fear memories. *Learning & Memory*, v. 24, n. 9, p. 392-399, 2017.

CAHILL, Larry; MCGAUGH, James L.; WEINBERGER, Norman M. The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. *Trends in neurosciences*, v. 24, n. 10, p. 578-581, 2001.

CAMMAROTA, Martín et al. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learning & Memory*, v. 11, n. 5, p. 572-578, 2004.

CHANG, Yao-Ju et al. Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear extinction in rats through estrogen receptor  $\beta$ . *Hippocampus*, v. 19, n. 11, p. 1142-1150, 2009.

CHEN, Dillon Y. et al. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature*, v. 469, n. 7331, p. 491-497, 2011.

CHECK HAYDEN, Erika. Sex bias blights drug studies. 2010.

CHHATWAL, Jasmeer P. et al. Amygdala BDNF signaling is required for consolidation but not encoding of extinction. *Nature neuroscience*, v. 9, n. 7, p. 870, 2006.

CLAYTON, Janine A. et al. NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature*, v. 509, n. 7500, p. 282-3, 2014.

CLAYTON, Janine Austin. Studying both sexes: a guiding principle for biomedicine. *The FASEB Journal*, v. 30, n. 2, p. 519-524, 2016.

COLLINS, Francis S.; TABAK, Lawrence A. NIH plans to enhance reproducibility. *Nature*, v. 505, n. 7485, p. 612, 2014.

CRESTANI, Ana Paula et al. Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation. *Scientific reports*, v. 5, p. 13633, 2015.

DALLA, Christina; SHORS, Tracey J. Sex differences in learning processes of classical and operant conditioning. *Physiology & behavior*, v. 97, n. 2, p. 229-238, 2009.

DA SILVA, Thiago R. et al. Evidence for an expanded time-window to mitigate a reactivated fear memory by tamoxifen. *European Neuropsychopharmacology*, v. 26, n. 10, p. 1601-1609, 2016.

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

DEBIEC, Jacek; BUSH, David EA; LEDOUX, Joseph E. Noradrenergic enhancement of reconsolidation in the amygdala impairs extinction of conditioned fear in rats—a possible mechanism for the persistence of traumatic memories in PTSD. *Depression and anxiety*, v. 28, n. 3, p. 186-193, 2011.

DEBIEC, Jacek; LEDOUX, Joseph E.; NADER, Karim. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron*, v. 36, n. 3, p. 527-538, 2002.

- DE LA FUENTE, Verónica; FREUDENTHAL, Ramiro; ROMANO, Arturo. Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 15, p. 5562-5573, 2011
- DELORENZI, A. et al. Memory beyond expression. *Journal of Physiology-Paris*, v. 108, n. 4, p. 307-322, 2014.
- DE OLIVEIRA ALVARES, L. et al. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience*, v. 154, n. 4, p. 1648-1655, 2008.
- DE OLIVEIRA ALVARES, L. et al. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*, v. 244, p. 42-48, 2013.
- DÍAZ-MATAIX, Lorenzo et al. Detection of a temporal error triggers reconsolidation of amygdala-dependent memories. *Current Biology*, v. 23, n. 6, p. 467-472, 2013.
- DIFEDE, JoAnn et al. D-cycloserine augmentation of exposure therapy for post-traumatic stress disorder: a pilot randomized clinical trial. *Neuropsychopharmacology*, v. 39, n. 5, p. 1052, 2014.
- DO MONTE, Fabricio H. et al. Infusion of cannabidiol into infralimbic cortex facilitates fear extinction via CB1 receptors. *Behavioural brain research*, v. 250, p. 23-27, 2013.
- DREXLER, Shira Meir et al. Cortisol effects on fear memory reconsolidation in women. *Psychopharmacology*, v. 233, n. 14, p. 2687-2697, 2016.
- DUDAI, Yadin. The restless engram: consolidations never end. *Annual review of neuroscience*, v. 35, p. 227-247, 2012.
- DUDAI, Y. *Memory from A to Z: keywords, concepts, and beyond*. Oxford University Press, v. 12, p. 211-2016, 2002.
- DUDAI, Yadin. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?. *Annu. Rev. Psychol.*, v. 55, p. 51-86, 2004.

DUDAI, Yadin. *The neurobiology of memory: concepts, findings, trends*. Oxford University Press, 1989.

DUNCAN, Carl P. The retroactive effect of electroshock on learning. *Journal of comparative and physiological psychology*, v. 42, n. 1, p. 32, 1949.

DUVARCI, Sevil; NADER, Karim. Characterization of fear memory reconsolidation. *Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 42, p. 9269-9275, 2004.

EATON, Nicholas R. et al. An invariant dimensional liability model of gender differences in mental disorder prevalence: evidence from a national sample. *Journal of abnormal psychology*, v. 121, n. 1, p. 282, 2012.

EISENBERG, Mark; DUDAI, Yadin. Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in *Medaka*: old fears don't die. *European Journal of Neuroscience*, v. 20, n. 12, p. 3397-3403, 2004.

EISENBERG, Mark et al. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science*, v. 301, n. 5636, p. 1102-1104, 2003.

ECKEL-MAHAN, Kristin L. et al. Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: implications for memory persistence. *Nature neuroscience*, v. 11, n. 9, p. 1074, 2008.

ESPEJO, Pablo Javier et al. Stress-induced resistance to the fear memory labilization/reconsolidation process. Involvement of the basolateral amygdala complex. ***Neuropharmacology***, v. 109, p. 349-356, 2016.

ETKIN, Amit; BÜCHEL, Christian; GROSS, James J. The neural bases of emotion regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 16, n. 11, p. 693, 2015.

EXTON-MCGUINNESS, Marc TJ; LEE, Jonathan LC; REICHEL, Amy C. Updating memories—the role of prediction errors in memory reconsolidation. *Behavioural brain research*, v. 278, p. 375-384, 2015.

FENTON, Georgina E. et al. Sex differences in learned fear expression and extinction involve altered gamma oscillations in medial prefrontal cortex. *Neurobiology of learning and memory*, v. 135, p. 66-72, 2016.

FERNÁNDEZ, Rodrigo S.; PEDREIRA, María E.; BOCCIA, Mariano M. Does reconsolidation occur in natural settings? Memory reconsolidation and anxiety disorders. *Clinical psychology review*, v. 57, p. 45-58, 2017.

FLEXNER, Louis B.; FLEXNER, Josefa B.; STELLAR, Eliot. Memory and cerebral protein synthesis in mice as affected by graded amounts of puromycin. *Experimental neurology*, v. 13, n. 3, p. 264-272, 1965.

FORCATO, C. et al. Human reconsolidation does not always occur when a memory is retrieved: the relevance of the reminder structure. *Neurobiology of learning and memory*, v. 91, n. 1, p. 50-57, 2009.

FORCATO, Cecilia; FERNANDEZ, Rodrigo S.; PEDREIRA, María E. Strengthening a consolidated memory: the key role of the reconsolidation process. *Journal of Physiology-Paris*, v. 108, n. 4, p. 323-333, 2014.

FORCATO, Cecilia et al. Reconsolidation of declarative memory in humans. *Learning & Memory*, v. 14, n. 4, p. 295-303, 2007.

FRANKLAND, Paul W.; BONTEMPI, Bruno. The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 6, n. 2, p. 119-130, 2005.

FRENKEL, Lia et al. Angiotensin modulates long-term memory expression but not long-term memory storage in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiology of learning and memory*, v. 94, n. 4, p. 509-520, 2010.

FRICK, Karyn M. et al. Estrogenic regulation of memory consolidation: A look beyond the hippocampus, ovaries, and females. *Physiology & behavior*, 2017.

GAFFORD, Georgette M.; PARSONS, Ryan G.; HELMSTETTER, Fred J. Effects of post-training hippocampal injections of midazolam on fear conditioning. *Learning & memory*, v. 12, n. 6, p. 573-578, 2005.

GAZARINI, Lucas et al. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting  $\alpha$ 1- and  $\beta$ -adrenergic receptors. *Learning & Memory*, v. 20, n. 4, p. 210-219, 2013.

GERARD, Ralph W. *Physiology and psychiatry*. *American Journal of Psychiatry*, v. 106, n. 3, p. 161-173, 1949.

GIACHERO, Marcelo; CALFA, Gaston D.; MOLINA, Victor A. Hippocampal structural plasticity accompanies the resulting contextual fear memory following stress and fear conditioning. *Learning & Memory*, v. 20, n. 11, p. 611-616, 2013.

GISQUET-VERRIER, Pascale et al. Integration of new information with active memory accounts for retrograde amnesia: a challenge to the consolidation/reconsolidation hypothesis? *Journal of Neuroscience*, v. 35, n. 33, p. 11623-11633, 2015.

GISQUET-VERRIER, Pascale; RICCIO, David C. Memory reactivation effects independent of reconsolidation. *Learning & Memory*, v. 19, n. 9, p. 401-409, 2012.

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

GOLDMAN, Jerome M.; MURR, Ashley S.; COOPER, Ralph L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, v. 80, n. 2, p. 84-97, 2007.

GORDON, William C.; SPEAR, Norman E. Effect of reactivation of a previously acquired memory on the interaction between memories in the rat. *Journal of experimental psychology*, v. 99, n. 3, p. 349, 1973.

GRAHAM, Bronwyn M.; MILAD, Mohammed R. Blockade of estrogen by hormonal contraceptives impairs fear extinction in female rats and women. *Biological psychiatry*, v. 73, n. 4, p. 371-378, 2013

GRAHAM, Bronwyn M.; MILAD, Mohammed R. Inhibition of estradiol synthesis impairs fear extinction in male rats. *Learning & memory*, v. 21, n. 7, p. 347-350, 2014.

- GRESACK, J. E. et al. Sex differences in contextual fear conditioning are associated with differential ventral hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation. *Neuroscience*, v. 159, n. 2, p. 451-467, 2009.
- GROSS, Cornelius; HEN, Rene. The developmental origins of anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 5, n. 7, p. 545-552, 2004
- GRUENE, Tina M. et al. Sexually divergent expression of active and passive conditioned fear responses in rats. *Elife*, v. 4, p. e11352, 2015.
- GUPTA, Rishi R. et al. Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear conditioning and hippocampal long-term potentiation (LTP) in rats. *Brain research*, v. 888, n. 2, p. 356-365, 2001.
- HALL, Jeremy; THOMAS, Kerrie L.; EVERITT, Barry J. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 6, p. 2186-2193, 2001.
- HAUBRICH, Josue et al. Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology*, v. 40, n. 2, p. 315-326, 2015.
- HARRIS, Justin A.; WESTBROOK, R. Fred. Evidence that GABA transmission mediates context-specific extinction of learned fear. *Psychopharmacology*, v. 140, n. 1, p. 105-115, 1998.
- HARRIS, Justin A.; WESTBROOK, R. Frederick. The benzodiazepine midazolam does not impair Pavlovian fear conditioning but regulates when and where fear is expressed. *Journal of Experimental Psychology-Animal Behavior Processes*, v. 25, n. 2, p. 236-246, 1999.
- HARRIS, Justin A.; WESTBROOK, Frederick R. Contextual control over the expression of fear in rats conditioned under a benzodiazepine. *Psychopharmacology*, v. 156, n. 1, p. 92-97, 2001
- HEBB, Donald O. et al. The organization of behavior: A neuropsychological theory. 1949.
- HELDT, S. A. et al. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Molecular psychiatry*, v. 12, n. 7, p. 656, 2007.

HERRY, Cyril et al. Neuronal circuits of fear extinction. *European Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 4, p. 599-612, 2010

IMHOF, Jania T. et al. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. *Behavioural brain research*, v. 56, n. 2, p. 177-180, 1993.

IZQUIERDO, Ivan et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in neurosciences*, v. 29, n. 9, p. 496-505, 2006..

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

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

JAMES, William. *The Principles of Psychology*, v. 2, 1890.

JAROME, Timothy J. et al. CaMKII regulates proteasome phosphorylation and activity and promotes memory destabilization following retrieval. *Neurobiology of learning and memory*, v. 128, p. 103-109, 2016.

JAROME, Timothy J. et al. The timing of multiple retrieval events can alter GluR1 phosphorylation and the requirement for protein synthesis in fear memory reconsolidation. *Learning & Memory*, v. 19, n. 7, p. 300-306, 2012.

JASNOW, Aaron M. et al. Perspectives on fear generalization and its implications for emotional disorders. *Journal of neuroscience research*, v. 95, n. 3, p. 821-835, 2017.

JOEL, Daphna; MCCARTHY, Margaret M. Incorporating sex as a biological variable in neuropsychiatric research: where are we now and where should we be? *Neuropsychopharmacology*, v. 42, n. 2, p. 379-385, 2017.

JOHANSEN, Joshua P. et al. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, v. 147, n. 3, p. 509-524, 2011.



JOHNSTON, G. A. R. GABAA receptor pharmacology. *Pharmacology & therapeutics*, v. 69, n. 3, p. 173-198, 1996.

JOHNSON, Luke R. et al. Pavlovian fear memory circuits and phenotype models of PTSD. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 2, p. 638-646, 2012.

JONASSON, Zachariah. Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 28, n. 8, p. 811-825, 2005.

JONES, Carolyn E.; MONFILS, Marie-H. Dominance status predicts social fear transmission in laboratory rats. *Animal cognition*, v. 19, n. 6, p. 1051-1069, 2016.

KASHEFI, Adel; RASHIDY-POUR, Ali. Effects of corticosterone on contextual fear consolidation in intact and ovariectomized female rats. *Neurobiology of learning and memory*, v. 114, p. 236-241, 2014.

KANDEL, Eric R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, v. 294, n. 5544, p. 1030-1038, 2001.

KESSLER, Ronald C. et al. Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *International journal of methods in psychiatric research*, v. 21, n. 3, p. 169-184, 2012.

KILPATRICK, Dean G. et al. National estimates of exposure to traumatic events and PTSD prevalence using DSM-IV and DSM-5 criteria. *Journal of traumatic stress*, v. 26, n. 5, p. 537-547, 2013.

KILKENNY, Carol et al. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *British journal of pharmacology*, v. 160, n. 7, p. 1577-1579, 2010.

KINDT, Merel. The surprising subtleties of changing fear memory: a challenge for translational science. *Phil. Trans. R. Soc. B*, v. 373, n. 1742, p. 20170033, 2018.

KITAMURA, Takashi et al. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*, v. 356, n. 6333, p. 73-78, 2017.

KOKRAS, N.; DALLA, C. Sex differences in animal models of psychiatric disorders. *British journal of pharmacology*, v. 171, n. 20, p. 4595-4619, 2014.

LABAR, Kevin S.; CABEZA, Roberto. Cognitive neuroscience of emotional memory. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 7, n. 1, p. 54-64, 2006.

LATTAL, K. Matthew; ABEL, Ted. Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 13, p. 4667-4672, 2004.

LATTAL, K. Matthew; RADULOVIC, Jelena; LUKOWIAK, Ken. 9YExtinction: does it or doesn't it? The requirement of altered gene activity and new protein synthesis. *Biological psychiatry*, v. 60, n. 4, p. 344-351, 2006

LEBRON-MILAD, Kelimer; MILAD, Mohammed R. Sex differences, gonadal hormones and the fear extinction network: implications for anxiety disorders. *Biology of mood & anxiety disorders*, v. 2, n. 1, p. 3, 2012.

LECHNER, Hilde A.; SQUIRE, Larry R.; BYRNE, John H. 100 years of consolidation—remembering Müller and Pilzecker. *Learning & Memory*, v. 6, n. 2, p. 77-87, 1999.

LEDOUX, Joseph E. Emotion circuits in the brain. *Annual review of neuroscience*, v. 23, n. 1, p. 155-184, 2000.

LEDOUX, Joseph E. *Synaptic self: How our brains become who we are*. Penguin, 2003.

LEDOUX, Joseph E.; PINE, Daniel S. Using neuroscience to help understand fear and anxiety: a two-system framework. *American journal of psychiatry*, v. 173, n. 11, p. 1083-1093, 2016.

LEE, Jonathan LC; EVERITT, Barry J.; THOMAS, Kerrie L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*, v. 304, n. 5672, p. 839-843, 2004.

LEE, Jonathan LC; NADER, Karim; SCHILLER, Daniela. An Update on Memory Reconsolidation Updating. *Trends in Cognitive Sciences*, 2017.

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

LEE, Jonathan LC; MILTON, Amy L.; EVERITT, Barry J. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 39, p. 10051-10056, 2006.

LEE, Sue-Hyun et al. Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science*, v. 319, n. 5867, p. 1253-1256, 2008.

LEUNER, Benedetta; SHORS, Tracey J. New spines, new memories. *Molecular neurobiology*, v. 29, n. 2, p. 117-130, 2004.

LEUNER, Benedetta; FALDUTO, Jacqueline; SHORS, Tracey J. Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 2, p. 659-665, 2003.

LEWIS, Donald J. Psychobiology of active and inactive memory. *Psychological bulletin*, v. 86, n. 5, p. 1054, 1979.

LEWIS, Donald J. Sources of experimental amnesia. *Psychological review*, v. 76, n. 5, p. 461, 1969.

LIBERZON, Israel; SRIPADA, Chandra Sekhar. The functional neuroanatomy of PTSD: a critical review. *Progress in brain research*, v. 167, p. 151-169, 2007.

LIN, Hui-Ching; MAO, Sheng-Chun; GEAN, Po-Wu. Block of  $\gamma$ -aminobutyric acid-A receptor insertion in the amygdala impairs extinction of conditioned fear. *Biological psychiatry*, v. 66, n. 7, p. 665-673, 2009.

LIU, Lidong et al. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science*, v. 304, n. 5673, p. 1021-1024, 2004.

LONG, Joseph Abraham; EVANS, Herbert McLean. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. University of California Press, 1922.

LOPEZ, Joëlle et al. Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. *Journal of Neuroscience*, v. 35, n. 6, p. 2465-2475, 2015.

LYNCH, M. A. Long-term potentiation and memory. *Physiological reviews*, v. 84, n. 1, p. 87-136, 2004.

MAENG, Lisa Y. et al. Estradiol shifts interactions between the infralimbic cortex and central amygdala to enhance fear extinction memory in female rats. *Journal of neuroscience research*, v. 95, n. 1-2, p. 163-175, 2017.

MAENG, Lisa Y.; MILAD, Mohammed R. Sex differences in anxiety disorders: interactions between fear, stress, and gonadal hormones. *Hormones and behavior*, v. 76, p. 106-117, 2015.

MAGGI, A.; PEREZ, J. Estrogen-Induced Up-Regulation of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Receptors in the CNS of Rodents. *Journal of neurochemistry*, v. 47, n. 6, p. 1793-1797, 1986.

MAJEWSKA, Maria Dorota et al. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, v. 232, n. 4753, p. 1004-1007, 1986.

MAKKAR, Steve R.; ZHANG, Shirley Q.; CRANNEY, Jacquelyn. Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. *Neuropsychopharmacology*, v. 35, n. 8, p. 1625-1652, 2010.

MAMIYA, Nori et al. Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 2, p. 402-413, 2009.

MAMOU, Cyrinne Ben; GAMACHE, Karine; NADER, Karim. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nature neuroscience*, v. 9, n. 10, p. 1237-1239, 2006.

MANZANARES, Pablo A. Rodríguez et al. Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic

plasticity in the rat basolateral amygdala. *Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 38, p. 8725-8734, 2005.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MARIN, Fernanda Navarro et al. Efeito de intervenções farmacológicas antes e/ou após a expressão generalizada de medo sobre a memória aversiva original em ratos. 2017.

MAREN, Stephen; PHAN, K. Luan; LIBERZON, Israel. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 14, n. 6, p. 417-428, 2013.

MAREN, Stephen; QUIRK, Gregory J. Neuronal signalling of fear memory. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 5, n. 11, p. 844-852, 2004.

MAREN, Stephen; DE OCA, Beatrice; FANSELOW, Michael S. Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. *Brain research*, v. 661, n. 1, p. 25-34, 1994.

MARKUS, Etan J.; ZECEVIC, Maja. Sex differences and estrous cycle changes in hippocampus-dependent fear conditioning. *Psychobiology*, v. 25, n. 3, p. 246-252, 1997.

MATSUDA, Shingo et al. Sex differences in fear extinction and involvements of extracellular signal-regulated kinase (ERK). *Neurobiology of learning and memory*, v. 123, p. 117-124, 2015.

MCCLELLAND, James L.; MCNAUGHTON, Bruce L.; O'REILLY, Randall C. Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychological review*, v. 102, n. 3, p. 419, 1995.

MCLEAN, Carmen P.; ANDERSON, Emily R. Brave men and timid women? A review of the gender differences in fear and anxiety. *Clinical psychology review*, v. 29, n. 6, p. 496-505, 2009.

MCCULLOUGH, Louise D. et al. NIH initiative to balance sex of animals in preclinical studies: generative questions to guide policy,

implementation, and metrics. *Biology of sex differences*, v. 5, n. 1, p. 15, 2014.

MCGAUGH, James L.; KRIVANEK, Jara A. Strychnine effects on discrimination learning in mice: effects of dose and time of administration. *Physiology & behavior*, v. 5, n. 12, p. 1437-1442, 1970.

MCGAUGH, James L. Making lasting memories: Remembering the significant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. Supplement 2, p. 10402-10407, 2013.

MCGAUGH, James L. Memory--a century of consolidation. *Science*, v. 287, n. 5451, p. 248-251, 2000..

MEHTA, Ashok K.; TICKU, Maharaj K. An update on GABA A receptors. *Brain Research Reviews*, v. 29, n. 2, p. 196-217, 1999.

MERLO, Emiliano et al. Reconsolidation and extinction are dissociable and mutually exclusive processes: Behavioral and molecular evidence. *Journal of Neuroscience*, v. 34, n. 7, p. 2422-2431, 2014.

MERLO, Emiliano; MILTON, Amy L.; EVERITT, Barry J. A Novel Retrieval-dependent Memory Process Revealed by the Arrest of ERK1/2 Activation in the Basolateral Amygdala. **Journal of Neuroscience**, p. 3273-17, 2018.

MILAD, Mohammed R.; QUIRK, Gregory J. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annual review of psychology*, v. 63, p. 129-151, 2012.

MILAD, Mohammed R.; QUIRK, Gregory J. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature*, v. 420, n. 6911, p. 70, 2002

MILAD, Mohammed R. et al. Fear conditioning and extinction: influence of sex and menstrual cycle in healthy humans. *Behavioral neuroscience*, v. 120, n. 6, p. 1196, 2006.

MILAD, Mohammed R. et al. Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. *Neuroscience*, v. 164, n. 3, p. 887-895, 2009.

MILAD, Mohammed R. et al. The influence of gonadal hormones on conditioned fear extinction in healthy humans. *Neuroscience*, v. 168, n. 3, p. 652-658, 2010.

MILTON, Amy L. et al. Double dissociation of the requirement for GluN2B- and GluN2A-containing NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory. *Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 3, p. 1109-1115, 2013.

MILLER, Courtney A.; SWEATT, J. David. Amnesia or retrieval deficit? Implications of a molecular approach to the question of reconsolidation. *Learning & Memory*, v. 13, n. 5, p. 498-505, 2006.

MILLER, Leah R. et al. Considering sex as a biological variable in preclinical research. *The FASEB Journal*, v. 31, n. 1, p. 29-34, 2017.

MILNER, Brenda; SQUIRE, Larry R.; KANDEL, Eric R. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, v. 20, n. 3, p. 445-468, 1998.

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

MONTI, Roque I. Ferrer et al. A comparison of behavioral and pharmacological interventions to attenuate reactivated fear memories. *Learning & Memory*, v. 24, n. 8, p. 369-374, 2017.

MONTI, Roque I. Ferrer et al. An appetitive experience after fear memory destabilization attenuates fear retention: involvement GluN2B-NMDA receptors in the Basolateral Amygdala Complex. *Learning & Memory*, v. 23, n. 9, p. 465-478, 2016.

MUELLER, Devin; PORTER, James T.; QUIRK, Gregory J. Noradrenergic signaling in infralimbic cortex increases cell excitability and strengthens memory for fear extinction. *Journal of neuroscience*, v. 28, n. 2, p. 369-375, 2008.

MÜLLER, Georg Elias; PILZECKER, Alfons. Experimentelle beiträge zur lehre vom gedächtniss. JA Barth, 1900.

MYERS, Karyn M.; DAVIS, Michael. Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron*, v. 36, n. 4, p. 567-584, 2002.

MYERS, Karyn M.; DAVIS, Michael. Mechanisms of fear extinction. 2007.

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

NADER, Karim. Memory traces unbound. *Trends in neurosciences*, v. 26, n. 2, p. 65-72, 2003.

NADER, Karim; SCHAFE, Glenn E.; LE DOUX, Joseph E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, v. 406, n. 6797, p. 722-726, 2000.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH et al. Consideration of sex as a biological variable in NIH-funded research. National Institutes of Health, 2015.

ORSINI, Caitlin A.; MAREN, Stephen. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 36, n. 7, p. 1773-1802, 2012.

PAIN, L. et al. Mechanisms of action of midazolam on expression of contextual fear in rats. *British journal of anaesthesia*, v. 89, n. 4, p. 614-621, 2002.

PAVLOV, I. P. *Conditioned reflexes*: London: Oxford UP. 1927.

PEDREIRA, María Eugenia; MALDONADO, Héctor. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*, v. 38, n. 6, p. 863-869, 2003.

PEDREIRA, María Eugenia; PÉREZ-CUESTA, Luis María; MALDONADO, Héctor. Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. *Learning & Memory*, v. 11, n. 5, p. 579-585, 2004.



PEREZ, J.; ZUCCHI, I.; MAGGI, A. Sexual dimorphism in the response of the GABAergic system to estrogen administration. *Journal of Neurochemistry*, v. 47, n. 6, p. 1798-1803, 1986.

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

PETERS, Jamie et al. Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. *Science*, v. 328, n. 5983, p. 1288-1290, 2010.

POWER, Ann E. et al. Anisomycin infused into the hippocampus fails to block “reconsolidation” but impairs extinction: the role of re-exposure duration. *Learning & memory*, v. 13, n. 1, p. 27-34, 2006.

PRZYBYSLAWSKI, Jean; SARA, Susan J. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behavioural brain research*, v. 84, n. 1, p. 241-246, 1997.

PRZYBYSLAWSKI, Jean; ROULLET, Pascal; SARA, Susan J. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: Role of  $\beta$  adrenergic receptors. *Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 15, p. 6623-6628, 1999.

PIÑEYRO, Marcelo E. et al. Memory destabilization is critical for the success of the reactivation–extinction procedure. *Learning & memory*, v. 21, n. 1, p. 46-54, 2014.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral neuroscience*, v. 106, n. 2, p. 274, 1992.

PLOSKI, Jonathan E.; MCINTYRE, Christa K. Emotional modulation of synapses, circuits and memory. *Frontiers in behavioral neuroscience*, v. 9, 2015.

PUIA, G. et al. On the putative physiological role of allopregnanolone on GABA A receptor function. *Neuropharmacology*, v. 44, n. 1, p. 49-55, 2003.

RODRIGUEZ-ORTIZ, Carlos J. et al. Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learning & Memory*, v. 12, n. 5, p. 533-537, 2005.

QUIRK, Gregory J.; GARCIA, René; GONZÁLEZ-LIMA, Francisco. Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. *Biological psychiatry*, v. 60, n. 4, p. 337-343, 2006.

QUIRK, Gregory J.; MUELLER, Devin. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 1, p. 56-72, 2008.

RABINOWITZ, Akiva et al. The neurosteroid allopregnanolone impairs object memory and contextual fear memory in male C57BL/6J mice. *Hormones and behavior*, v. 66, n. 2, p. 238-246, 2014.

RAMIKIE, Teniel Sonya; RESSLER, Kerry James. Mechanisms of Sex Differences in Fear and PTSD. *Biological psychiatry*, 2017.

RAO-RUIZ, Priyanka et al. Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nature neuroscience*, v. 14, n. 10, p. 1302-1308, 2011.

RODRIGUEZ-ORTIZ, Carlos J. et al. Taste aversion memory reconsolidation is independent of its retrieval. *Neurobiology of learning and memory*, v. 98, n. 3, p. 215-219, 2012.

RAUCH, Scott L.; SHIN, Lisa M.; PHELPS, Elizabeth A. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research—past, present, and future. *Biological psychiatry*, v. 60, n. 4, p. 376-382, 2006.

RESCORLA, Robert A. Conditioned inhibition and extinction. *Mechanisms of learning and motivation: A memorial volume to Jerzy Konorski*, p. 83-110, 1979.

RESCORLA, Robert A.; HETH, C. Donald. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, v. 1, n. 1, p. 88, 1975.

RESCORLA, Robert A.; WAGNER, A. R.; A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. *Classical conditioning II: Current research and theory*, v. 2, p. 64-99, 1972.

RICHARDSON, Sarah S. et al. Opinion: focus on preclinical sex differences will not address women's and men's health

disparities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 44, p. 13419-13420, 2015.

ROBERTS, D. C. S.; BENNETT, S. A. L.; VICKERS, G. J. The estrous cycle affects cocaine self-administration on a progressive ratio schedule in rats. *Psychopharmacology*, v. 98, n. 3, p. 408-411, 1989.

ROSAS-VIDAL, Luis E. et al. Hippocampal–prefrontal BDNF and memory for fear extinction. *Neuropsychopharmacology*, v. 39, n. 9, p. 2161, 2014.

ROSENFELD, Cheryl S. Brain Sexual Differentiation and Requirement of SRY: Why or Why Not?. *Frontiers in neuroscience*, v. 11, 2017.

ROY, Dheeraj S. et al. Distinct neural circuits for the formation and retrieval of episodic memories. *Cell*, v. 170, n. 5, p. 1000-1012. e19, 2017

RUSSO, S. J. et al. Gonadal hormones differentially modulate cocaine-induced conditioned place preference in male and female rats. *Neuroscience*, v. 120, n. 2, p. 523-533, 2003.

SANDSTROM, Noah J.; KAUFMAN, Jordy; HUETTEL, Scott A. Males and females use different distal cues in a virtual environment navigation task. *Cognitive Brain Research*, v. 6, n. 4, p. 351-360, 1998.

SANTINI, Edwin et al. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 25, p. 5704-5710, 2004.

SANTINI, Edwin; MULLER, Robert U.; QUIRK, Gregory J. Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 22, p. 9009-9017, 2001.

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

SCHACTER, Daniel L.; ADDIS, Donna Rose; BUCKNER, Randy L. Remembering the past to imagine the future: the prospective brain. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 8, n. 9, p. 657-661, 2007

SCHAFE, Glenn E. et al. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends in neurosciences*, v. 24, n. 9, p. 540-546, 2001.

SCHILLER, Daniela et al. Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature*, v. 463, n. 7277, p. 49, 2010.

SCHNEIDER, Allen M.; SHERMAN, William. Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. *Science*, v. 159, n. 3811, p. 219-221, 1968.

SEHLMAYER, Christina et al. Human fear conditioning and extinction in neuroimaging: a systematic review. *PloS one*, v. 4, n. 6, p. e5865, 2009.

SEVENSTER, Dieuwke; BECKERS, Tom; KINDT, Merel. Retrieval per se is not sufficient to trigger reconsolidation of human fear memory. *Neurobiology of learning and memory*, v. 97, n. 3, p. 338-345, 2012.

SEVENSTER, Dieuwke; BECKERS, Tom; KINDT, Merel. Prediction error governs pharmacologically induced amnesia for learned fear. *Science*, v. 339, n. 6121, p. 830-833, 2013.

SEVENSTER, Dieuwke; BECKERS, Tom; KINDT, Merel. Prediction error demarcates the transition from retrieval, to reconsolidation, to new learning. *Learning & Memory*, v. 21, n. 11, p. 580-584, 2014.

SFIKAKIS, Anastasia et al. Implication of the estrous cycle on conditioned avoidance behavior in the rat. *Physiology & Behavior*, v. 21, n. 3, p. 441-446, 1978.

SHANSKY, Rebecca M. Sex differences in behavioral strategies: avoiding interpretational pitfalls. *Current opinion in neurobiology*, v. 49, p. 95-98, 2018.

SHANSKY, Rebecca M. Sex differences in PTSD resilience and susceptibility: Challenges for animal models of fear learning. *Neurobiology of stress*, v. 1, p. 60-65, 2015.

SHANSKY, Rebecca M.; WOOLLEY, Catherine S. Considering sex as a biological variable will be valuable for neuroscience research. *Journal of Neuroscience*, v. 36, n. 47, p. 11817-11822, 2016.

SHORS, Tracey J.; CHUA, Chadrick; FALDUTO, Jacqueline. Sex differences and opposite effects of stress on dendritic spine density in the male versus female hippocampus. *Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 16, p. 6292-6297, 2001.

SIERRA-MERCADO, Demetrio; PADILLA-COREANO, Nancy; QUIRK, Gregory J. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, v. 36, n. 2, p. 529, 2011.

SOETER, Marieke; KINDT, Merel. Stimulation of the noradrenergic system during memory formation impairs extinction learning but not the disruption of reconsolidation. *Neuropsychopharmacology*, v. 37, n. 5, p. 1204-1215, 2012.

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

SOTRES-BAYON, Francisco; BUSH, David EA; LEDOUX, Joseph E. Acquisition of fear extinction requires activation of NR2B-containing NMDA receptors in the lateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*, v. 32, n. 9, p. 1929-1940, 2007.

SOTRES-BAYON, Francisco; BUSH, David EA; LEDOUX, Joseph E. Emotional perseveration: an update on prefrontal-amygdala interactions in fear extinction. *Learning & Memory*, v. 11, n. 5, p. 525-535, 2004.

SOTRES-BAYON, Francisco; QUIRK, Gregory J. Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Current opinion in neurobiology*, v. 20, n. 2, p. 231-235, 2010.

SQUIRE, Larry R.; ALVAREZ, Pablo. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Current opinion in neurobiology*, v. 5, n. 2, p. 169-177, 1995

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

STERN, Cristina AJ et al. On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: evidence from cannabidiol treatment. *Neuropsychopharmacology*, v. 37, n. 9, p. 2132-2142, 2012.

STOCKHORST, Ursula; ANTOV, Martin I. Modulation of fear extinction by stress, stress hormones and estradiol: a review. *Frontiers in behavioral neuroscience*, v. 9, p. 359, 2016.

SUZUKI, Akinobu et al. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learning & memory*, v. 15, n. 6, p. 426-433, 2008.

SUZUKI, Akinobu et al. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 20, p. 4787-4795, 2004.

SZAPIRO, German et al. The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus*, v. 13, n. 1, p. 53-58, 2003.

TORREGROSSA, Mary M.; TAYLOR, Jane R. Learning to forget: manipulating extinction and reconsolidation processes to treat addiction. *Psychopharmacology*, v. 226, n. 4, p. 659-672, 2013.

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

TULVING, Endel. Ecphoric processes in episodic memory. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, v. 302, n. 1110, p. 361-371, 1983.

VANVOSSSEN, Ana C. et al. Newly acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prelimbic cortex NMDA receptors. *Neurobiology of learning and memory*, v. 137, p. 154-162, 2017.

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

WALKER, David L.; DAVIS, Michael. The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 71, n. 3, p. 379-392, 2002.

WARREN, Stacey G.; JURASKA, Janice M. Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behavioral neuroscience*, v. 111, n. 2, p. 259, 1997.

WEILAND, N. G. et al. Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. *Journal of Comparative Neurology*, v. 388, n. 4, p. 603-612, 1997.

WESTBROOK, R. Frederick et al. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus: two roles for context. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, v. 28, n. 1, p. 97, 2002.

WOOLLEY, Catherine S.; MCEWEN, Bruce S. Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. *Journal of Neuroscience*, v. 14, n. 12, p. 7680-7687, 1994.

WOOD, Gwendolyn E.; BEYLIN, Anna V.; SHORS, Tracey J. The contribution of adrenal and reproductive hormones to the opposing effects of stress on trace conditioning males versus females. *Behavioral neuroscience*, v. 115, n. 1, p. 175, 2001.

WOOD, Nellie E. et al. Pharmacological blockade of memory reconsolidation in posttraumatic stress disorder: three negative psychophysiological studies. *Psychiatry research*, v. 225, n. 1, p. 31-39, 2015.

YAMAMOTO, Shigeto et al. Effects of single prolonged stress and D-cycloserine on contextual fear extinction and hippocampal NMDA receptor expression in a rat model of PTSD. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 9, p. 2108, 2008.

YANG, Y. L.; LU, Kwok-Tung. Facilitation of conditioned fear extinction by d-cycloserine is mediated by mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase cascades and requires de novo protein synthesis in basolateral nucleus of amygdala. *Neuroscience*, v. 134, n. 1, p. 247-260, 2005.

YEHUDA, R.; JOËLS, M.; MORRIS, R. G. The memory paradox. *Nature Reviews Neuroscience*, v.11, n.12, p.837-839. 2010.

YEHUDA, Rachel. Current status of cortisol findings in post-traumatic stress disorder. *Psychiatric Clinics of North America*, v. 25, n. 2, p. 341-368, 2002.

YE, Xiaojing et al. Direct dorsal hippocampal–prelimbic cortex connections strengthen fear memories. *Nature neuroscience*, v. 20, n. 1, p. 52, 2017.

ZEIDAN, Mohamed A. et al. Estradiol modulates medial prefrontal cortex and amygdala activity during fear extinction in women and female rats. *Biological psychiatry*, v. 70, n. 10, p. 920-927, 2011.

ZHANG, Shirley; CRANNEY, Jacquelyn. The role of GABA and anxiety in the reconsolidation of conditioned fear. *Behavioral neuroscience*, v. 122, n. 6, p. 1295, 2008.

## APÊNDICE A - RESULTADOS SUPLEMENTARES

---

Experimento suplementar 1: Efeito da intensidade do treino sobre a expressão do congelamento no contexto pareado e não pareado

A ANOVA com medidas repetidas indicou efeito da intensidade do treino [ $F_{(2,36)} = 9,40$ ;  $P = 0,0005$ ], e da re-exposição [ $F_{(2,72)} = 24,40$ ;  $P = 0,0000$ ], mas não houve interação os fatores [ $F_{(4,72)} = 1,20$ ;  $P = 0,30$ ;] em relação ao tempo de congelamento durante as exposições ao Contexto A, conforme apresentado na figura suplementar 2. Quando expostas ao Contexto B, a ANOVA de uma via com medidas repetidas demonstrou interação entre os fatores [ $F_{(2,36)} = 4,09$ ;  $P = 0,02$ ].



O teste de post-hoc de Newman-Keuls mostrou que durante a sessão de Evocação, Teste A1 e o TA2 o grupo 1 mA + IOI apresentou níveis superiores na porcentagem de congelamento em relação ao grupo 0,7 mA. Entretanto, não houve diferença em relação ao grupo 1 mA em nenhuma das sessões de teste A. Durante a sessão de teste A2, todos os grupos apresentaram redução nos níveis de congelamento quando comparados a sessão de evocação. Avaliados em conjunto, estes dados sugerem que o a intensidade do choque associado a administração de IOI no dia do pareamento no Contexto A, influencia nos níveis de congelamento tanto no contexto pareado, quanto no contexto não pareado (Contexto B) e que este padrão tende a se manter ao longo do tempo, evidenciado pela diferença encontrada até 21 dias depois.

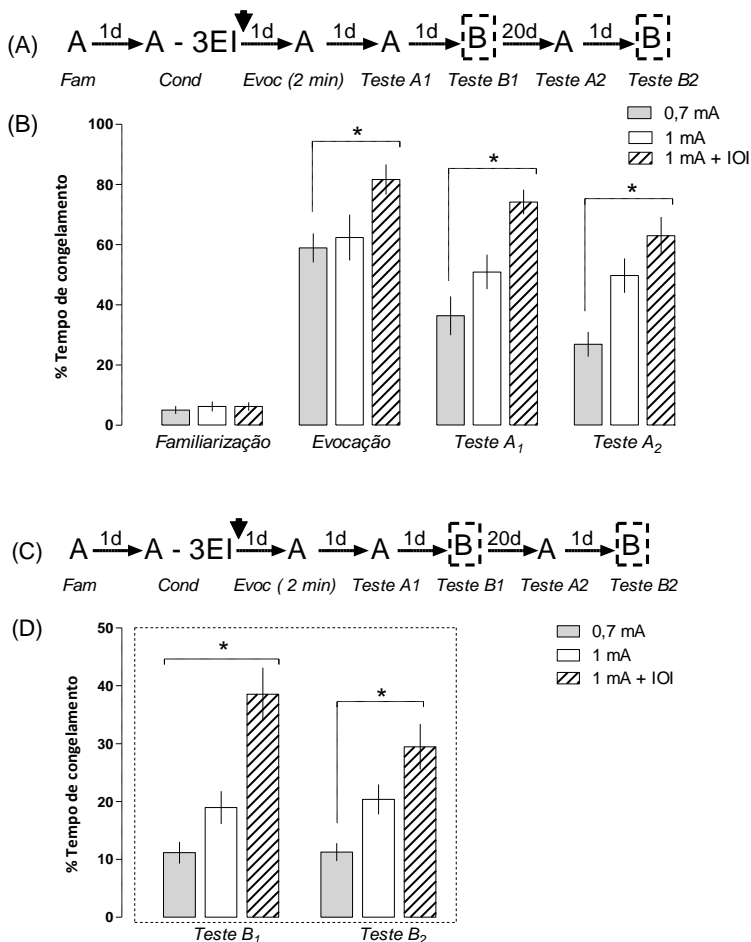


Figura suplementar 1: A intensidade do treino no dia do condicionamento influencia na expressão de congelamento no contexto pareado e não pareado (experimento suplementar 1). (A) e (C) Protocolo experimental (B) Efeito da intensidade do treino (estímulo incondicionado e ou ioimbina 2 mg/kg i.p.) sobre a expressão de congelamento durante a sessão de evocação e re-exposições ao Contexto pareado e (D) sobre o nível de congelamento no Contexto não pareado. Os dados são representados com Média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento (n = 9-10 / grupo, 0,7 mA: P=3; E=4; D=3; 1 mA: P=4; E=3; D=2; 1 mA + IOI: P=3; E=3; D=3) \* indica uma diferença significativa em relação ao grupo 0,7 mA durante o mesmo teste. Nível de significância adotado (P < 0,05).

ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Newman – Keuls para comparações nos Testes A e B.

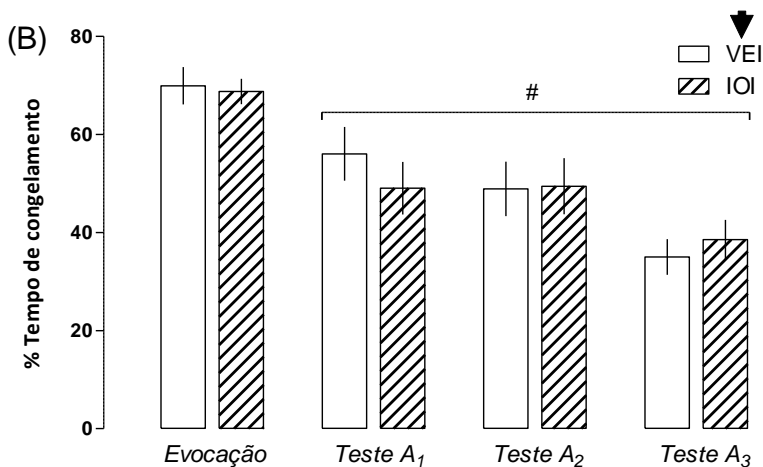
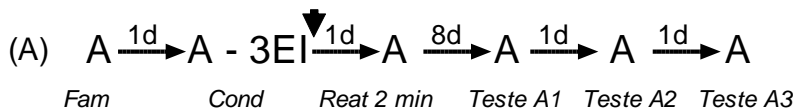
Experimento suplementar 2: Efeito das re-exposições sucessivas ao Contexto pareado sobre os níveis de congelamento 1 ou 9 dias depois do condicionamento

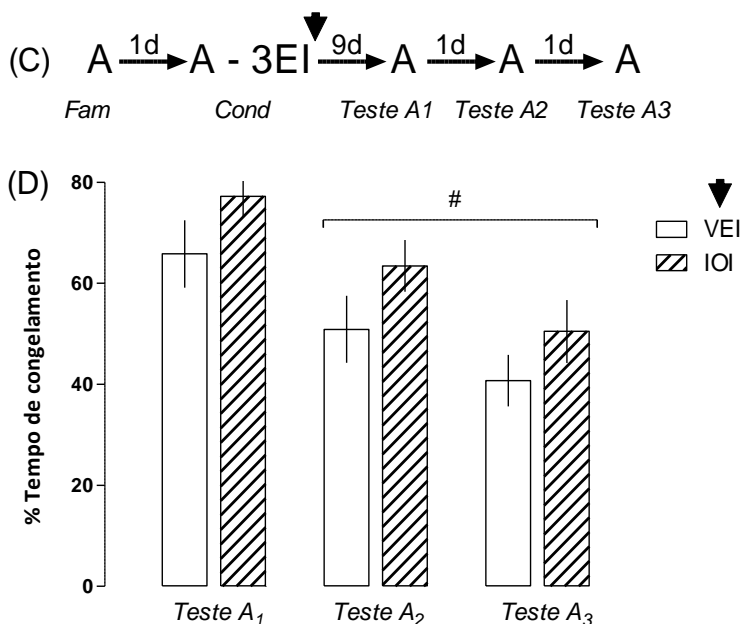
Com o propósito de investigar se re-exposições sucessivas ao contexto pareado conduzem a redução da expressão de congelamento ou se esta redução é devida à fatores temporais entre o dia do pareamento e a sessão de evocação, 45 ratas foram alocadas com base no tratamento sistêmico (VEI ou IOI 2 mg/ Kg) no dia do pareamento e 2 abordagens experimentais diferentes foram conduzidas. Na primeira abordagem 21 ratas (n= 10 – 11 / grupo) realizaram a sessão de evocação no Contexto A por 2 min e 8 dias depois foram submetidas aos Testes A1, A2 e A3 respectivamente com 1 dia de intervalo entre cada teste. Na segunda abordagem 24 ratas (n= 11 - 12 / grupo) não realizaram a sessão de evocação de 2 min e foram submetidas diretamente a sessão de Teste A1, conduzida 9 dias depois do pareamento. No dia seguinte, os grupos foram expostos aos Testes A2 e A3, respectivamente, com 1 dia de intervalo entre os testes.

A ANOVA de uma via com medidas repetidas apontou efeito da re-exposição ao Contexto A [ $F_{(3,57)} = 27,39$ ;  $P = 0,00000$ ] mas não do tratamento com ioimbina [ $F_{(1,19)} = 0,043$ ;  $P = 0,043$ ]. Não houve interação entre o tratamento com IOI e a re-exposição ao Contexto A [ $F_{(3,57)} = 0,75$ ;  $P = 0,52$ ]. O teste de post-hoc de Newman-Keuls mostrou que durante o Teste A1, ambos os grupos apresentam redução nos níveis de congelamento em relação a sessão de evocação que perdurou nos testes A2 e A3. Em relação, no Teste A3 o tratamento com ioimbina manteve elevado os níveis de congelamento entre as sucessivas re-exposições ao Contexto A. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com IOI e VEI em nenhuma re-exposição ao Contexto A.

Quando os grupos não foram expostos a sessão de evocação de dois min um dia depois do condicionamento, a ANOVA com medidas repetidas apontou efeito da re-exposição ao Contexto A [ $F_{(2,44)} = 41,46$ ;  $P = 0,00000$ ] mas não do tratamento com ioimbina [ $F_{(1,22)} = 2,30$ ;  $P = 0,14$ ]. Entretanto, houve interação entre o tratamento com IOI e a re-exposição ao Contexto A [ $F_{(2,44)} = 0,12$ ;  $P = 0,88$ ]. O teste de post-hoc de

Newman-Keuls mostrou que durante o Teste A1, ambos os grupos apresentam níveis de congelamento semelhantes. Em relação aos Testes A2 e A3 todos os grupos apresentam redução da expressão de congelamento, e os grupos VEI e IOI não diferem entre si.





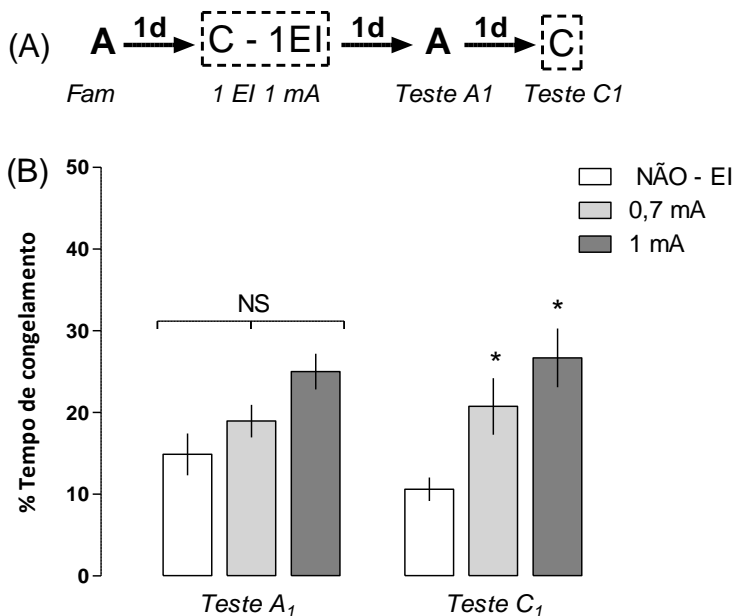
**Figura suplementar 2: Re-exposições sucessivas ao contexto pareado conduzem a redução dos níveis de congelamento e não a fração temporal entre cada a re-exposição (experimento suplementar 2).** (A) Protocolo experimental. (B) Representação gráfica da evocação e das sessões de Teste A1, A2 e A3. (C) Protocolo experimental. (D) Representação gráfica dos estes A1, A2 e A3. Os dados são representados com Média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento ( $n = 10-11$  grupo, VEI: P=2; E=3; D=4; IOI: P=3; E=3; D=4 fig. B; VEI: P=4; E=3; D=3; IOI: P=3; E=3; D=5 fig. D). # indica uma diferença significativa do mesmo grupo em relação a sessão de evocação.  $\Sigma$  indica uma diferença significativa do mesmo grupo em relação ao Teste A2. Nível de significância adotado  $P < 0,05$ . A seta indica a o momento da administração do tratamento. ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Newman – Keuls para comparações no Contexto A.

Experimento suplementar 3: Efeito da intensidade do choque no Contexto C sobre a expressão de congelamento no Contexto

Para investigar se a intensidade do EI administrado no Contexto C aumenta expressão de congelamento durante a sessão de Teste A1 e

Teste C1, 3 grupos foram alocados de acordo com a intensidade de choque administrado durante o Contexto C (NÃO – EI, 0,7 mA ou 1 mA) e avaliados durante o Teste A1 e C1. A ANOVA de uma via com medidas repetidas indicou que não ocorreu efeito do da intensidade do choque [ $F_{(2, 24)} = 9,41$ ;  $P = 0,00096$ ], da repetição [ $F_{(1,24)} = 0,21$ ;  $P = 0,88$ ] ou interação entre os fatores [ $F_{(2, 24)} = 1,21$ ;  $P = 0,31$ ].

O teste de post-hoc de Newman-Keuls demonstrou que durante a sessão de Teste A1 não houve diferença entre os grupos em relação ao nível de congelamento. Entretanto, durante a exposição ao Teste C1 os grupos que receberam um único EI de 0,7 mA ou 1 mA apresentaram níveis de congelamento superiores ao grupo que permaneceu no Contexto C e não recebeu EI. Estes resultados indicam que a administração do EI de 0,7 mA no Contexto C, per se não aumenta significativamente o nível de congelamento durante o Teste A1. Por outro lado, o aumento do nível de congelamento é superior em relação ao grupo NÃO – EI é detectado apenas durante o Teste C1.



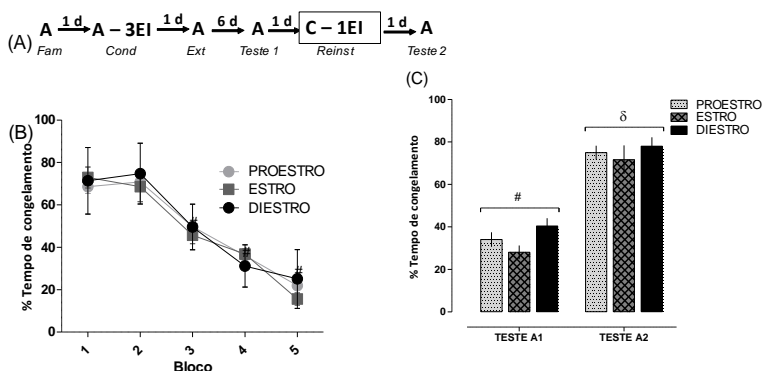
**Figura suplementar 3: Administração do EI no Contexto C per se não é suficiente para aumentar a expressão de congelamento no Contexto A (experimento suplementar 3).** (A) Protocolo experimental. (B) Representação gráfica das sessões de Teste A<sub>1</sub> e C<sub>1</sub>. Os dados são representados com Média ± E.P.M. da porcentagem de congelamento (n = 9 / grupo, NÃO - EI: P=3; E=2; D=4; 0,7 mA: P=3; E=3; D=3; 1 mA: P=3; E=3; D=3). \* indica uma diferença significativa em relação ao grupo NÃO - EI (P < 0,05). ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Newman - Keuls (comparações entre nos Testes A<sub>1</sub> e C<sub>1</sub>).

Experimento suplementar 4: Efeito da fase do ciclo estral sobre a expressão da memória de medo contextual durante a exposição de tempo intermediário ao contextos pareado

A ANOVA de uma via com medidas repetidas apontou efeito do bloco de extinção [ $F_{(4, 108)} = 171,71$ ;  $P = 0,0000$ ] (comparações entre todos os blocos). Mas não houve efeito da fase do ciclo estral [ $F_{(2,27)} = 0,176$ ;  $P = 0,83$ ] sobre os níveis de congelamento ao longo da sessão e, também não ocorreu interação entre os blocos da extinção e a fase do ciclo estral [ $F_{(8, 108)} = 1,24$ ;  $P = 0,28$ ]. Em relação aos Testes A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> não

ocorreu efeito da fase do ciclo estral [ $F_{(2,27)} = 1,67$ ;  $P = 0,206$ ], mas houve efeito da re-exposição ao Contexto A [ $F_{(1, 27)} = 257,87$ ;  $P = 0,00000$ ], entretanto, sem interação entre os fatores [ $F_{(2, 27)} = 0,46$ ;  $P = 0,636$ ].

O teste de post-hoc de Newman-Keuls demonstrou que durante os níveis de congelamento de todos os grupos decaíram ao longo da sessão marcada pela diferença entre o 1 e o último bloco da sessão de extinção. Quando avaliados quanto a retenção da memória de extinção, todas as fases do ciclo estral apresentaram nível de congelamento inferior ao 1 bloco da extinção. Após a sessão de reinstalação, no Teste A3 todas as fases do ciclo estral apresentaram reinstalação do medo, evidenciado por um aumento nos níveis de congelamento em relação ao Teste A1. Não houve diferença entre as fases do ciclo estral, tanto em relação a aquisição da extinção quanto nos testes A1 e A2.



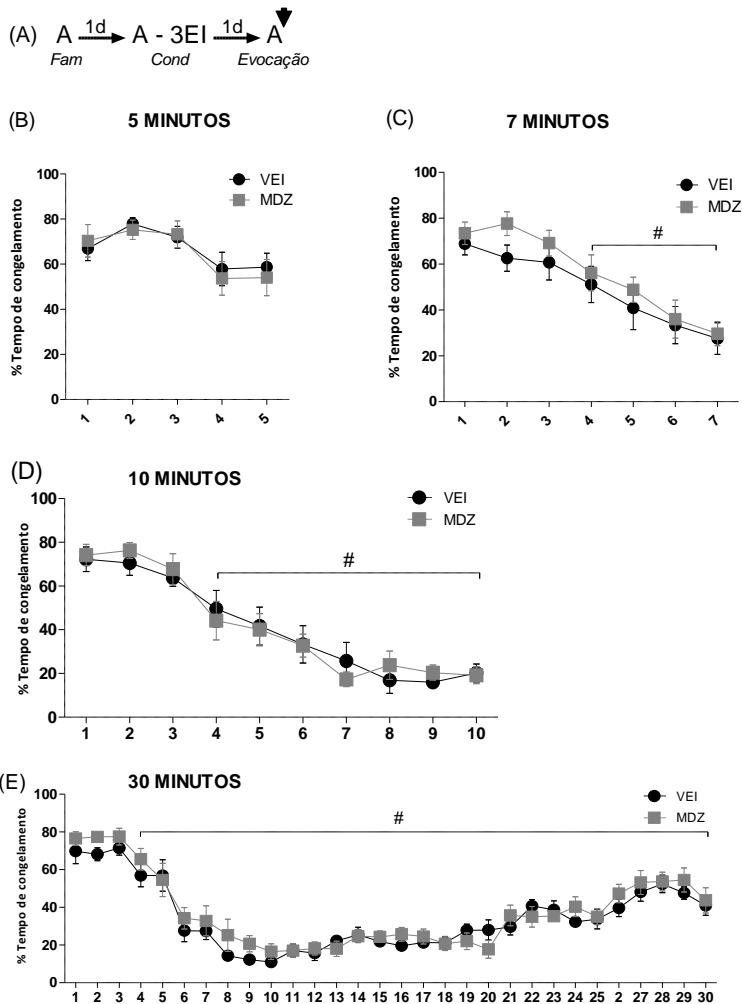
**Figura suplementar 4: A fase do ciclo estral não tem influência sobre a expressão da memória de medo contextual em uma sessão de re-exposição intermediária (experimento suplementar 4).** (A) Protocolo experimental. (B) Curso temporal da sessão de extinção de 10 min. (C) Representação gráfica do teste A1 e A2. Os dados são representados como Média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento. O símbolo de microscópio indica o momento da verificação da fase do ciclo estral# indica uma diferença em relação ao 1 Bloco da sessão de extinção ( $P < 0,05$ ).  $\delta$  indica uma diferença significativa em relação ao TA1 e ao 5 Bloco da sessão de extinção ( $P < 0,05$ ). ANOVA de uma via com medidas repetidas (comparações entre os blocos da curva temporal e no Contexto A) seguida pelo teste post-hoc de Newman – Keuls.



Figura suplementar 5: Curso temporal da expressão de congelamento no contexto paredo durante as sessões de 5, 7, 10 e 30 min

A ANOVA de uma via com medidas repetidas indicou que ocorreu efeito do tempo da sessão de 5 min [ $F_{(4,72)} = 8,11$ ;  $P = 0,00002$ ], 7 min [ $F_{(1,18)} = 0,04$ ;  $P = 0,83$ ] e 10 min [ $F_{(6,90)} = 25,34$ ;  $P = 0,0000$ ].

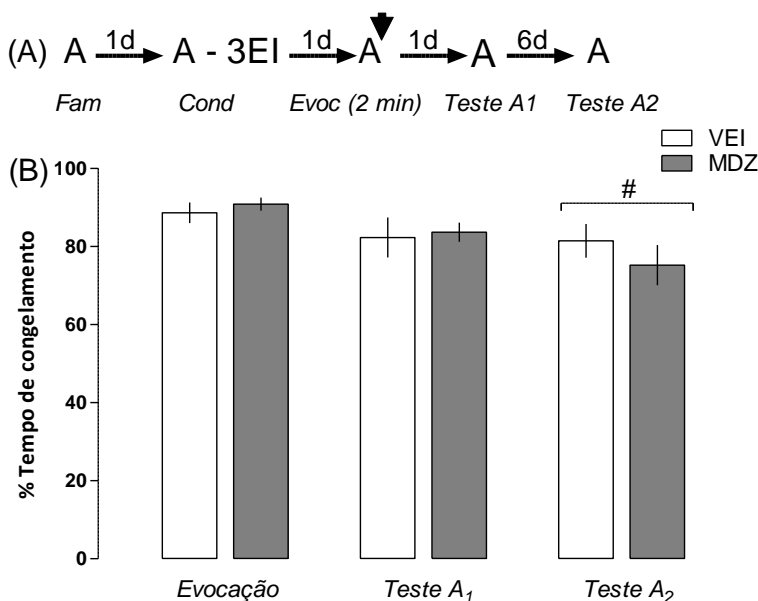
O teste de post-hoc de Newman-Keuls mostrou que durante a sessão de 5 minutos, o nível de congelamento não difere entre os postos da sessão ( $P > 0,05$ ). Durante as sessões de 7 e 10 o nível de congelamento reduz a partir do 4º minuto da curva e todos os pontos subsequentes diferem do primeiro minuto da respectiva sessão.



**Figura suplementar 5: Representação gráfica do curso temporal das sessões de re-exposição de 5, 7, 10 e 30 min.** (A) Protocolo experimental em comum entre as sessões. (B) reexposição de 5 min (C) 7 min, (D) 10 min e (E) 30 min. # indica uma diferença significativa do mesmo grupo em relação ao primeiro ponto da curva temporal. A seta indica o momento da administração do tratamento. Nível de significância adotado ( $P < 0,05$ ). ANOVA de uma via com medidas repetidas para comparações no Contexto A seguida pelo teste post-hoc de Newman – Keuls.

Figura suplementar 6: Sessão de re-exposição de 2 min não é suficiente para induzir a labilização em machos

A ANOVA de uma via com medidas repetidas indicou que não ocorreu efeito do tratamento com MDZ [ $F_{(1,16)} = 0,05$ ;  $P = 0,81$ ] mas houve efeito da re-exposição [ $F_{(1,18)} = 5,89$ ;  $P = 0,006$ ], entretanto, não ocorreu interação entre os fatores tratamento e re-exposição [ $F_{(2,32)} = 0,96$ ;  $P = 0,39$ ] para o tempo de congelamento no contexto pareado. A informação estatística relevante mostrou que durante a sessão de evocação e de Teste A não houve diferença entre os grupos quanto ao nível de congelamento.



**Figura suplementar 6: A sessão de re-exposição de 2 min não é suficiente para induzir a labilização da memória em machos (experimento suplementar 5).** (A) Protocolo experimental. (B) Representação gráfica da sessão de evocação e de Testes A. Os dados são representados como Média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento. # indica uma diferença em relação a sessão de evocação. Nível de significância adotado ( $P < 0,05$ ). ANOVA de uma via com medidas repetidas (comparações no Contexto A) seguida pelo teste post-hoc de Newman – Keuls.

