

Felipe Vanz

**PAPEL DOS RECEPTORES KAPPA OPIOIDES DO
HIPOCAMPO DORSAL NA CONSOLIDAÇÃO E
RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA
AVERSIVA CONTEXTUAL**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thereza
Christina Monteiro de Lima
Coorientador: Prof. Dr. Leandro
José Bertoglio

Florianópolis
2018

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

Vanz, Felipe

Papel dos receptores kappa opioides do hipocampo dorsal na consolidação e reconsolidação da memória aversiva contextual / Felipe Vanz ; orientadora, Thereza Christina Monteiro de Lima, coorientador, Leandro José Bertoglio, 2018.

166 p.

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

Inclui referências.

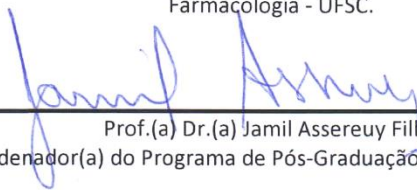
1. Farmacologia. 2. Hipocampo dorsal. 3. Condicionamento aversivo contextual. 4. Consolidação de memória. 5. Receptores k opioides. I. De Lima, Thereza Christina Monteiro. II. Bertoglio, Leandro José. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

"Papel dos receptores Kappa opioides do hipocampo dorsal na consolidação e reconsolidação da memória aversiva contextual"

Por

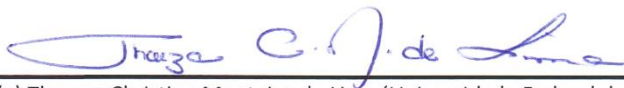
Felipe Vanz

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (009/2018/PPGFMC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



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

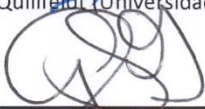
Banca examinadora:



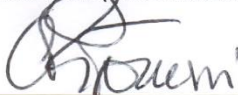
Dr.(a) Thereza Christina Monteiro de Lima (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr.(a) Jorge Alberto Quillfeldt (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)



Dr.(a) Geison de Souza Izidio (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Carlos Rogério Tonussi (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 26 de junho de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos Vanz e Salete da Rosa Raschke Vanz

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos Vanz e Salete da Rosa Raschke Vanz, pelo exemplo de dedicação, perseverança, respeito, carinho e amor incondicional, esses que serviram de base para a construção do meu caráter. Além disso, muito obrigado por toda a dedicação e apoio que me proporcionaram! Graças a vocês, eu pude finalizar mais esta importante e gratificante etapa da minha formação.

Ao Prof. Dr. Leandro José Bertoglio e a Prof^a. Dr^a. Thereza Christina Monteiro de Lima, pela confiança depositada e disposição em me acompanhar e orientar na realização desse trabalho, bem como pelo crescimento científico e pessoal proporcionado.

Ao Dr. Marcelo Giachero, por compartilhar o seu conhecimento, sempre me desafiando intelectualmente.

Ao Dr. Vagner Fagnani Linartevichi, pelo crescimento científico e pessoal proporcionado, além da grande amizade, é claro! Serei eternamente grato por você ter compartilhado seu conhecimento comigo desde o primeiro momento.

À Dr^a. Maíra Assunção Bicca, pelo crescimento científico e por ter colaborado com esse trabalho, sempre com muito otimismo.

À Dr^a. Franciane Bobinski e a Me. Katiane Roversi por terem aceitado colaborar com esse trabalho.

À Jaqueline Maisa Franzen, Hugo Bayer e Lucas Mascarin pela grande amizade, suporte e parceria científica e pessoal que construímos ao longo de todos esses anos!

À Dani, que com sua dedicação, paciência e amor, sempre me fez acreditar que eu chegaria ao final dessa que foi, até agora, a etapa mais desafiadora e gratificante da minha formação.

Aos membros da banca, Dr. Prof. Jorge Alberto Quillfeldt, Geison Izídio, Carlos Rogério Tonussi, além dos membros suplentes, Dr. Prof. Lucas de Oliveira Alvares e Dr. Prof. Antônio de Pádua Carobrez, por aceitarem o convite para compor a banca e pela colaboração no aperfeiçoamento desse trabalho.

Aos demais amigos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia e Neurofarmacologia, Rafael, Fernanda T., Fernanda M., Bárbara, Ericks, Renata, Ana C.J., Cristiele e Gleison, pelo carinho e ensinamentos.

Aos amigos que a vida me presenteou, Evandro, Josué, Rafael, Giovane, Daniel, Aroldo e Aislan, os quais sempre participaram dos momentos importantes desta minha caminhada.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Farmacologia da UFSC.

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

RESUMO

Os principais receptores κ opioides (κ ORs) já descritos (κ_1 ORs e κ_2 ORs) são expressos em regiões cerebrais envolvidas no processamento de memórias aversivas, incluindo o hipocampo dorsal (HD). No entanto, o papel dos HD κ ORs na consolidação e reconsolidação de memórias aversivas, com intensidades e especificidades variadas, ainda não está claro. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar essa questão utilizando agentes farmacológicos em ratos submetidos a um protocolo de condicionamento aversivo contextual (CAC) fraco, moderado ou forte. A hipótese desse trabalho foi de que o antagonista dos HD κ ORs potencializa a consolidação e a reconsolidação de memórias aversivas contextuais mais intensas e generalizadas em ratos, ao passo que o agonista dos κ ORs exerce um papel oposto sobre essas mesmas etapas, sendo a intensidade da experiência associativa aversiva crítica para o envolvimento desses receptores. Em relação à consolidação da memória, o antagonismo de HD κ ORs com a *nor*-binaltorfimina (*nor*-BNI) imediatamente após um CAC moderado, mas não 6 h após, aumentou a expressão do comportamento de congelamento durante a reexposição ao contexto pareado, o que indica que a ativação dos HD κ ORs tem um papel inibitório na consolidação de uma memória aversiva. Um aumento da imunomarcagem dos HD κ ORs foi observado 1 h e 3 h após o CAC moderado. Essa suprarregulação estava ausente em animais que foram apenas expostos ao contexto ou apenas ao choque, indicando que esse fenômeno requer um pareamento choque-contexto para ocorrer. A microinfusão de *nor*-BNI também aumentou os níveis de BDNF no HD 90 min após o CAC moderado, sugerindo uma possível via pela qual o antagonismo dos HD κ ORs levou à potencialização da consolidação da memória. Além disso, a *nor*-BNI não induziu alterações sobre o comportamento de congelamento no protocolo de CAC fraco, mas foi capaz de aumentar a expressão do comportamento de congelamento em um contexto novo e não pareado após um CAC forte, indicando que os HD κ ORs também modulam a consolidação de uma memória mais intensa e generalizada. Por outro lado, a microinfusão intra-HD do agonista dos κ_2 ORs, o GR 89696, mas não do agonista dos κ_1 ORs (U-69593), reduziu a expressão de congelamento no contexto pareado no protocolo de CAC forte.

Este efeito parece estar relacionado aos menores níveis de BDNF encontrados no HD 90 min após a microinfusão intra-HD de GR 89696. O pré-tratamento com uma dose subefetiva de *nor*-BNI preveniu os efeitos do GR 89696 sobre a expressão do comportamento de congelamento. Em relação à reconsolidação da memória, a microinfusão intra-HD de *nor*-BNI (antagonista κ OR) imediatamente após a reativação da memória, mas não 6 h após, foi capaz de aumentar a expressão de congelamento no contexto novo e não pareado no protocolo de CAC forte, indicando que os HD κ ORs também modulam a reconsolidação dessa memória. Nenhum efeito foi observado quando a *nor*-BNI foi administrada no protocolo de CAC moderado. Além disso, a microinfusão intra-HD de GR 89696 (agonista κ_2 OR) imediatamente após a reativação da memória, mas não 6 h após, reduziu a expressão de congelamento no contexto pareado no protocolo de CAC forte. Adicionalmente, o comportamento de congelamento não foi reinstalado no grupo GR 89696 após um choque lembrete, indicando que a ativação dos HD κ_2 ORs prejudicou a reconsolidação da memória aversiva. Por outro lado, o efeito do GR 89696 foi prevenido pelo pré-tratamento com uma dose subefetiva de *nor*-BNI. Em conjunto, as evidências experimentais supracitadas indicam que os HD κ ORs regulam negativamente a consolidação e a reconsolidação de memórias aversivas contextuais em ratos com intensidade e especificidade variadas.

Palavras-chave: Hipocampo dorsal. Condicionamento aversivo contextual. Consolidação de memória. Reconsolidação de memória. Receptores κ opioides.

ABSTRACT

The main κ opioid receptors (κ ORs) already described (κ_1 ORs and κ_2 ORs) are expressed in brain regions involved in aversive memory processing, including the dorsal hippocampus (DH). However, the role of DH κ ORs in the consolidation and reconsolidation of aversive memories with varied intensity and specificity is still uncertain. The present study aimed to investigate this question using pharmacological agents in rats subjected to weak, moderate or strong contextual aversive conditioning (CAC) protocol. The hypothesis of this work was that DH κ ORs antagonist potentiates the consolidation and reconsolidation of more intense and generalized contextual aversive memories in rats, whereas that DH κ ORs agonist plays an opposite role on these same memory stages, being the degree of intensity of the aversive associative experience critical for the involvement of these receptors. In memory consolidation investigation, antagonism DH κ ORs with *nor*-binaltorphimine (*nor*-BNI), immediately after, but not 6 h later, a moderate CAC increased freezing behavior expression during the reexposure to the paired context, indicating that DH κ ORs activation have an inhibitory role in the consolidation of an aversive memory. Increased DH κ ORs immunoblotting content was observed 1 h and 3 h after the moderate CAC. This up-regulation was absent in animals only exposed to the context or to the shock, indicating that this phenomenon requires a shock-context pairing to occur. *Nor*-binaltorphimine infusion also increased BDNF levels in DH 90 min after CAC moderate, suggesting a possible pathway by which DH κ OR antagonism led to the potentialization of memory consolidation. Moreover, *nor*-BNI induced no changes in freezing behavior following a weak CAC, but it was able to increase the expression of freezing in novel and unpaired context after a strong CAC, indicating that DH κ ORs also modulate the consolidation of a more intense and generalized memory. On the other hand, infusing the κ_2 ORs agonist GR 89696, but not the κ_1 ORs agonist U-69593, into the DH reduced the conditioned freezing expression in the strong CAC protocol. This effect seems to be related to the lower levels of BDNF founded in DH 90 min after intra-DH GR 89696 infusion. *Nor*-binaltorphimine pretreatment in a sub-effective dose prevented the GR 89696 effects on freezing behavior expression. In memory

reconsolidation investigation, intra-DH *nor*-BNI (κ OR antagonist) infusion immediately after, but not 6 h later, memory reactivation was able to increase the expression of freezing behavior in novel and unpaired context in the strong CAC protocol, indicating that DH κ ORs also modulate the reconsolidation of this memory. No effect was observed when *nor*-BNI was administered in moderate CAC protocol. Moreover, infusing the GR 89696 (κ_2 OR agonist) into the DH immediately after, but not 6 h later, memory reactivation reduced the conditioned freezing expression in the strong CAC protocol. In addition, freezing behavior did not show reinstatement in the GR 89696 group after a reminder shock, indicating that DH κ_2 ORs activation impaired the reconsolidation of the aversive memory. On the other hand, GR 89696 effect was prevented by pretreatment with a sub-effective dose of *nor*-BNI. Altogether, the above experimental evidence indicates that DH κ ORs negatively regulate the consolidation and reconsolidation of contextual aversive memories in rats with varied intensity and specificity.

Keywords: Dorsal hippocampus. Contextual aversive conditioning. Memory consolidation. Memory reconsolidation. κ opioid receptors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das primeiras etapas de formação das memórias.....	31
Figura 2. Representação esquemática da etapa de evocação da memória.	34
Figura 3. Representação esquemática da etapa de desestabilização e reestabilização do traço de memória.	36
Figura 4. Representação esquemática da estrutura hipocampal.	45
Figura 5. Esquema geral da circuitaria clássica que envolve os κ ORs e a dinorfina.	50
Figura 6. Imagem representativa do local de microinfusão das drogas no HD e diagrama esquemático mostrando os três principais locais de microinfusão (círculos preenchidos; 3,60 mm posterior ao <i>Bregma</i>).	60
Figura 7. Protocolo geral de condicionamento aversivo contextual utilizado em laboratório.	63
Figura 8. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC moderado.....	82
Figura 9. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs 6 h após um CAC moderado.....	83
Figura 10. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após a exposição no contexto A sem a experiência do choque.	84
Figura 11. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após uma experiência de choque não associada ao contexto.	85
Figura 12. Efeito do CAC moderado sobre a imunomarcção de HD κ ORs durante o período de consolidação da memória.	88
Figura 13. Avaliação da especificidade da imunomarcção dos HD κ ORs na formação da memória associativa.....	90
Figura 14. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC moderado sobre os	

níveis de BDNF hipocampais durante a consolidação da memória.	92
Figura 15. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC forte.....	94
Figura 16. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs 6 h após um CAC forte.	95
Figura 17. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC fraco.....	97
Figura 18. Efeito do agonista seletivo dos κ 2ORs imediatamente após um CAC forte.	99
Figura 19. Efeito do agonista seletivo dos κ 2ORs 6 h após um CAC forte.	100
Figura 20. Efeito do agonista seletivo dos κ 1ORs imediatamente após um CAC forte.	101
Figura 21. Efeito do agonista dos κ 2ORs imediatamente após um CAC forte sobre os níveis de BDNF hipocampais durante a consolidação da memória.	103
Figura 22. Efeito do pré-tratamento com nor-BNI sobre o prejuízo de consolidação da memória induzido pelo GR 89696.	105
Figura 23. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC moderado.	106
Figura 24. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente ou 6 h após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC forte.	109
Figura 25. Efeito do agonista dos κ 2ORs imediatamente ou 6 h após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC forte.	112
Figura 26. Efeito do agonista dos κ 2ORs imediatamente após a reativação no protocolo de reinstalação.....	114

Figura 27. Efeito do pré-tratamento com nor-BNI sobre o prejuízo de reconsolidação da memória induzido pelo GR 89696.	116
Figura 28. Efeito da microinfusão intra-HD de nor-BNI ou de GR 89696 imediatamente após a sessão de reativação no teste de borrifagem com sacarose.	118
Figura 29. Representação esquemática dos principais achados deste trabalho.....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC moderado sobre a consolidação da memória em um período de tempo mais remoto.....	86
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: Micrograma

µL: Microlitro

ABL: Amígdala basolateral

ANOVA: Análise de variância

AP: Antero-posterior

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (do inglês, *α -amino 3-hydroxy 5-methyl 4-isoxazolepropionic acid*)

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

Arc: Proteína associada ao citoesqueleto regulada por ativação (do inglês, *activity-regulated cytoskeleton-associated protein*)

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *brain derived neurotrophic factor*)

BSA: Albumina do soro bovino (do inglês, *bovine serum albumin*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

CA: Corno de Amon

CAC: Condicionamento aversivo contextual

CaMKII: Proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina (do inglês, *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*)

cDNA: DNA complementar

CPFm: Córtex pré-frontal medial

CREB: Proteína de ligação ao elemento responsivo do AMP cíclico (do inglês, *cAMP-response element binding protein*)

DV: Dorsal-ventral

EC: Estímulo condicionado

EI: Estímulo incondicionado

ELISA: Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*)

EN: Estímulo neutro

EPM: Erro padrão da média

GD: Giro denteado

h: Horas

HD: Hipocampo dorsal

HD κ ORs: Receptores κ opioides expressos no hipocampo dorsal

HD κ_1 ORs: Receptores κ_1 opioides expressos no hipocampo dorsal

HD κ_2 ORs: Receptores κ_2 opioides expressos no hipocampo dorsal

HV: Hipocampo ventral

i.c.v.: Administração de drogas via intracerebroventricular

intra-HD: Administração de drogas via intra-hipocampo dorsal

i.p.: Administração de drogas via intraperitoneal

Kg: Quilogramas

κ ORs: Receptores κ opioides

κ_1 ORs: Receptores κ_1 opioides

κ_2 ORs: Receptores κ_2 opioides

LTP: Potenciação de longo prazo (do inglês *long-term potentiation*)

mA: Miliampères

MAPK: Proteína cinase ativada por mitógenos (do inglês, *mitogen activated protein kinases*)

MCD: Memória de curta duração

MCP: Matéria cinzenta periaquedutal

mg: Miligramas

min: Minutos

ML: Medial-lateral

NMDA: N-metil-D-aspartato

***nor*-BNI:** *nor*-binaltorfimina

NPs: Neuropeptídeos

PBS: Tampão fosfato salina

PKA: Proteína cinase A

s: Segundos

SNC: Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	O PROCESSAMENTO DINÂMICO DAS MEMÓRIAS	28
1.1.1	Formação das memórias: a etapa de consolidação	29
1.1.2	Plasticidade neuronal envolvida na formação das memórias	31
1.1.3	Acessando uma memória: o processo de evocação ...	33
1.1.4	Reconsolidação da memória	35
1.1.5	Extinção da memória	38
1.1.6	Generalização comportamental	39
1.2	ESTUDANDO A NEUROBIOLOGIA DAS MEMÓRIAS AVERSIVAS: O CONDICIONAMENTO AVERSIVO CONTEXTUAL.....	41
1.3	O HIPOCAMPO, AS MEMÓRIAS E OS NEUROPEPTÍDEOS	43
1.4	SISTEMA DINORFINÉRGICO	47
1.4.1	Receptor κ opioide hipocampal nos processos de aprendizado e memória	50
2	HIPÓTESE	53
3	OBJETIVOS	55
3.1	OBJETIVO GERAL.....	55
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
4	MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1	ANIMAIS	57
4.2	DROGAS	57
4.3	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA, PROCEDIMENTO DE MICROINFUSÃO DAS DROGAS E HISTOLOGIA.....	58
4.4.	PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS.....	60
4.4.1	Protocolo geral de condicionamento aversivo contextual (CAC)	60
4.4.2	Protocolo de reinstalação da memória aversiva contextual	64
4.4.3	Teste de borrifagem com sacarose	65
4.5	ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	65
4.6	ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO LIGADO À ENZIMA (ELISA)	67
4.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	68
4.7.1	Experimento 1: Efeito da microinfusão do antagonista dos κORs imediatamente após um CAC moderado	68

4.7.2	Experimento 2: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs 6 h após um CAC moderado	68
4.7.3	Experimento 3: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após a exposição no contexto A sem a experiência do choque	68
4.7.4	Experimento 4: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após uma experiência de choque não pareada ao contexto	69
4.7.5	Experimento 5: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC moderado sobre a consolidação da memória em um período de tempo mais remoto	70
4.7.6	Experimento 6: Efeito do CAC moderado sobre a imunomarcção de HD κ ORs durante o período de consolidação da memória	70
4.7.7	Experimento 7: Avaliação da especificidade da imunomarcção dos HD κ ORs na formação da memória associativa	71
4.7.8	Experimento 8: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC moderado sobre os níveis de BDNF hipocampais durante a consolidação da memória	71
4.7.9	Experimento 9: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC forte	72
4.7.10	Experimento 10: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs 6 h após um CAC forte	72
4.7.11	Experimento 11: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC fraco	73
4.7.12	Experimento 12: Efeito do agonista seletivo dos κ_2 ORs imediatamente após um CAC forte	73
4.7.13	Experimento 13: Efeito do agonista seletivo dos κ_2 ORs 6 h após um CAC forte.....	74
4.7.14	Experimento 14: Efeito do agonista seletivo dos κ_1 ORs imediatamente após um CAC forte	74
4.7.15	Experimento 15: Efeito do agonista dos κ_2 ORs imediatamente após um CAC forte sobre os níveis de BDNF hipocampais durante a consolidação da memória.....	74

4.7.16	Experimento 16: Efeito do pré-tratamento com <i>nor</i> -BNI sobre o prejuízo de consolidação da memória induzido pelo GR 89696	75
4.7.17	Experimento 17: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC moderado	75
4.7.18	Experimento 18: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC forte	76
4.7.19	Experimento 19: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs 6 h após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC forte	76
4.7.20	Experimento 20: Efeito do agonista dos κ_2 ORs imediatamente após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC forte	77
4.7.21	Experimento 21: Efeito do agonista dos κ_2 ORs 6 h após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC forte	77
4.7.22	Experimento 22: Efeito do agonista dos κ_2 ORs imediatamente após a reativação no protocolo de reinstalação	77
4.7.23	Experimento 23: Efeito do pré-tratamento com <i>nor</i> -BNI sobre o prejuízo de reconsolidação da memória induzido pelo GR 89696	78
4.7.24	Experimento 24: Efeito da microinfusão de <i>nor</i> -BNI imediatamente após a reativação no teste de borrifagem com sacarose	79
4.7.25	Experimento 25: Efeito da microinfusão de GR 89696 imediatamente após a reativação no teste de borrifagem com sacarose	79
4.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	79
5	RESULTADOS	81
5.1	EXPERIMENTO 1: O ANTAGONISTA DOS κ ORS POTENCIALIZA A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA EM UM CAC MODERADO	81
5.2	EXPERIMENTO 2: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS κ ORS NÃO TEM EFEITO SOBRE O	

	COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO QUANDO REALIZADA 6 H APÓS O CAC MODERADO.....	82
5.3	EXPERIMENTO 3: A NOR-BNI NÃO ATUA COMO UM ESTÍMULO INCONDICIONADO.....	83
5.4	EXPERIMENTO 4: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS NÃO TEM EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO NO PROTOCOLO DE DÉFICIT POR CHOQUE IMEDIATO...	84
5.5	EXPERIMENTO 5: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS INDUZ UM AUMENTO DO TEMPO DE CONGELAMENTO QUE PERDURA POR PELO MENOS 28 DIAS	86
5.6	EXPERIMENTO 6: O CAC MODERADO AUMENTA A IMUNOMARCAÇÃO DOS HDKORS DURANTE O PERÍODO DE CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA	87
5.7	EXPERIMENTO 7: A EXPERIÊNCIA ASSOCIATIVA AVERSIVA INDUZ AUMENTO DA IMUNOMARCAÇÃO DOS HDKORS DURANTE A CONSOLIDAÇÃO	89
5.8	EXPERIMENTO 8: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS AUMENTA OS NÍVEIS DE BDNF NO HD DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA	91
5.9	EXPERIMENTO 9: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS INDUZ A EXPRESSÃO GENERALIZADA DO COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO NO PROTOCOLO DE CAC FORTE ..	93
5.10	EXPERIMENTO 10: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS NÃO TEM EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO QUANDO REALIZADA 6 H APÓS UM CAC FORTE	94
5.11	EXPERIMENTO 11: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS NÃO AFETA A EXPRESSÃO DE CONGELAMENTO NO PROTOCOLO DE CAC FRACO..	95
5.12	EXPERIMENTO 12: A MICROINFUSÃO DO AGONISTA DOS K ₂ ORS PREJUDICA A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA APÓS O CAC FORTE	97
5.13	EXPERIMENTO 13: A MICROINFUSÃO DO AGONISTA DOS K ₂ ORS NÃO TEM EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO QUANDO REALIZADA 6 H APÓS UM CAC FORTE	99

5.14	EXPERIMENTO 14: A MICROINFUSÃO DO AGONISTA DOS K ₁ ORS NÃO TEM EFEITO SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA	100
5.15	EXPERIMENTO 15: A MICROINFUSÃO DO AGONISTA DOS K ₂ ORS DIMINUI OS NÍVEIS DE BDNF NO HD DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA	102
5.16	EXPERIMENTO 16: O PRÉ-TRATAMENTO COM NOR-BNI PREVINE O PREJUÍZO DE CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA INDUZIDO PELO GR 89696 NO PROTOCOLO DE CAC FORTE	104
5.17	EXPERIMENTO 17: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS APÓS A REATIVAÇÃO NÃO AFETA O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO NO PROTOCOLO DE CAC MODERADO.....	105
5.18	EXPERIMENTO 18: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS IMEDIATAMENTE APÓS A REATIVAÇÃO INDUZ A EXPRESSÃO GENERALIZADA DO COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO NO PROTOCOLO DE CAC FORTE.....	107
5.19	EXPERIMENTO 19: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS NÃO TEM EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO QUANDO REALIZADA 6 H APÓS A REATIVAÇÃO NO PROTOCOLO DE CAC FORTE.....	107
5.20	EXPERIMENTO 20: A MICROINFUSÃO DO AGONISTA DOS K ₂ ORS APÓS A REATIVAÇÃO DIMINUI A EXPRESSÃO DE CONGELAMENTO NO PROTOCOLO DE CAC FORTE	110
5.21	EXPERIMENTO 21: A MICROINFUSÃO DO AGONISTA DOS K ₂ ORS NÃO TEM EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO QUANDO REALIZADA 6 H APÓS A REATIVAÇÃO NO PROTOCOLO DE CAC FORTE.....	110
5.22	EXPERIMENTO 22: A MICROINFUSÃO DO AGONISTA DOS K ₂ ORS PROMOVE PREJUÍZO DE RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA NO PROTOCOLO DE CAC FORTE	113
5.23	EXPERIMENTO 23: O PRÉ-TRATAMENTO COM NOR-BNI PREVINE O PREJUÍZO DE RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA INDUZIDO PELO GR 89696 NO PROTOCOLO DE CAC FORTE	114

5.24	EXPERIMENTO 24: A MICROINFUSÃO DE <i>NOR</i> -BNI IMEDIATAMENTE APÓS A REATIVAÇÃO NÃO ALTERA O ESTADO MOTIVACIONAL DOS ANIMAIS NO TESTE DE BORRIFAGEM COM SACAROSE.....	116
5.25	EXPERIMENTO 25: A MICROINFUSÃO DE GR 89696 IMEDIATAMENTE APÓS A REATIVAÇÃO NÃO ALTERA O ESTADO MOTIVACIONAL DOS ANIMAIS NO TESTE DE BORRIFAGEM COM SACAROSE.....	117
6	DISCUSSÃO	119
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	135
	REFERÊNCIAS	139
	ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL	165

1 INTRODUÇÃO

Desde a sua descoberta, o sistema opioide endógeno é “rotulado” como um sistema analgésico. Dentre os três receptores opioides clássicos já descritos (μ , δ e κ), em humanos, o receptor κ opioide seria o alvo menos atrativo do ponto de vista farmacológico (PFEIFFER *et al.*, 1986; WALSH *et al.*, 2001). Porém, nos últimos anos, uma série de achados tem relatado uma importante contribuição desses receptores na regulação do humor e no processamento de memórias aversivas, sendo esse último, o foco de estudo desse trabalho.

Embora as memórias aversivas apresentem alto valor adaptativo, memórias excessivamente aversivas podem se tornar não adaptativas ou disfuncionais (YEHUDA *et al.*, 2010; PERUSINI, FANSELOW, 2015). Por esse motivo, é fundamental compreendermos os mecanismos neurobiológicos envolvidos na formação e manutenção das memórias aversivas.

Nesse cenário, o hipocampo é uma das regiões cerebrais cruciais para o processamento dessas memórias e que contém alta densidade de receptores opioides e seus ligantes endógenos (GALL *et al.*, 1981; MCLEAN *et al.*, 1987; MANSOUR *et al.*, 1994; SIMMONS, CHAVKIN, 1996). Nessa estrutura, o papel funcional dos receptores opioides parece seguir caminhos opostos: enquanto que a ativação dos receptores μ ou δ opioides aumenta a atividade dessa estrutura cerebral (COHEN *et al.*, 1992; CAPOGNA *et al.*, 1993; REKLING, 1993; SVOBODA, LUPICA *et al.*, 1998), a ativação dos receptores κ opioides (κ ORs) promove o efeito oposto (WAGNER *et al.*, 1992, 1993; WEISSKOPF *et al.*, 1993; SIMMONS *et al.*, 1994).

Assim, os dados sugerem que, diferente dos receptores μ e δ opioides, os κ ORs poderiam desempenhar um papel inibitório sobre a formação e/ou manutenção de memórias. Adicionalmente, dados obtidos a partir de estudos *in vivo* sugerem que esses receptores sejam recrutados em condições de estresse, tal como nas experiências aversivas (SHIRAYAMA *et al.*, 2004; OGREN *et al.*, 2010), o que poderia tornar os κ ORs um alvo terapêutico promissor no campo das memórias traumáticas. Aliado a isso, com o avanço no entendimento dos mecanismos celulares e moleculares, novos agonistas desses receptores vêm surgindo, os quais vêm ganhando notoriedade por não mais induzirem efeitos disfóricos e sedativos, fato que

limitou, por exemplo, o uso clínico dos antigos agonistas de κ ORs (PFEIFFER *et al.*, 1986; WALSH *et al.*, 2001).

Diante do exposto, esse trabalho foi delineado com o intuito de investigar o papel dos κ ORs, expressos na região do hipocampo dorsal de ratos, fornecendo evidências farmacológicas, comportamentais e bioquímicas de que esses receptores são requeridos durante a consolidação e a reconsolidação de memórias aversivas contextuais mais intensas, onde desempenham um papel inibitório sobre essas etapas de processamento da memória. Para isso, como ponto de partida, se faz necessária a compreensão dos processos de formação e manutenção de uma memória.

1.1 O PROCESSAMENTO DINÂMICO DAS MEMÓRIAS

Muito do nosso entendimento acerca do mundo e da nossa própria existência é construído com base nas informações que aprendemos e armazenamos no nosso cérebro ao longo do tempo. No entanto, mais do que meramente armazenar informações, as memórias podem modelar comportamentos com base nas informações previamente armazenadas (experiências prévias do indivíduo), permitindo assim, no contexto fisiológico, a execução da resposta mais adequada frente a uma determinada situação (DUDAI, 1989, 2002). Porém, frente ao grande volume de informações que um indivíduo é exposto diariamente, é de se esperar que apenas algumas delas sejam armazenadas de forma duradoura, indicando que existem mecanismos específicos capazes de sinalizar e determinar a relevância das informações a serem armazenadas.

Nesse sentido, a emoção envolvida durante o aprendizado pode criticamente afetar o processamento de uma memória, de maneira que esta passa a ser armazenada de maneira mais intensa e duradoura, mas às vezes de forma menos específica (HAMANN, 2001; McGAUGH, 2013). Por exemplo, a formação e o armazenamento de memórias relacionadas com eventos de valência emocional negativa (aversiva) possuem alto valor adaptativo, pois fornecem suporte para garantir a execução de comportamentos adequados e necessários para manter a integridade e sobrevivência do organismo (JOËLS *et al.*, 2011; McGAUGH, 2013). Por outro lado, o valor adaptativo de memórias excessivamente aversivas é, ao menos em parte,

perdido, uma vez que estas tendem a resultar na distorção da percepção de perigo (YEHUDA *et al.*, 2010). Em humanos, esta parece ser uma das bases para o desenvolvimento de transtornos associados às memórias traumáticas (KILPATRICK *et al.*, 2013).

Algumas características das memórias traumáticas podem ser estudadas em animais de laboratório. Em roedores, por exemplo, memórias aversivas formadas de maneira muito intensa e duradoura podem levar ao desenvolvimento da expressão potencializada de respostas defensivas, mesmo quando o animal for exposto às pistas não relacionadas com o evento aversivo associado no momento do aprendizado (PITMAN, 1989; GAZARINI *et al.*, 2013). Portanto, uma melhor compreensão do processamento dinâmico das memórias se faz necessária para entendermos os possíveis mecanismos neurobiológicos que sustentam as memórias aversivas.

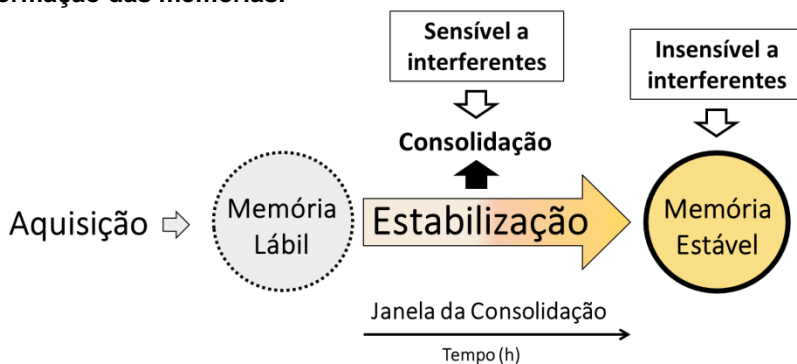
1.1.1 Formação das memórias: a etapa de consolidação

Quando um indivíduo é confrontado com um evento qualquer, as informações relacionadas com essa experiência são adquiridas mediante um processo chamado de aquisição da memória (ou aprendizado) (DUDAI, 2002). Imediatamente após, uma versão temporária dessa memória (denominada de memória de curta duração, MCD) já se encontra disponível (IZQUIERDO *et al.*, 1999). A MCD por si só é capaz de guiar um comportamento em curto prazo, caso seja necessário. Entretanto, para que essa memória possa perdurar no cérebro como uma memória de longa duração (MLD) (DUDAI, 2004), circuitos específicos de neurônios recrutados durante a formação da memória precisam sofrer modificações e alterações plásticas para sustentar, ao longo do tempo, o armazenamento dessas informações. Essas modificações requerem o envolvimento complexo e temporalmente orquestrado de estruturas cerebrais, sistemas transmissores e eventos bioquímicos intracelulares (McINTYRE *et al.*, 2012; JAROME *et al.*, 2014). Portanto, as memórias não são formadas instantaneamente, mas sim necessitam de uma etapa gradual de estabilização para que possam ser armazenadas no cérebro de maneira duradoura (DUDAI, 2004).

Há muito tempo já haviam evidências que sugeriam a existência de uma etapa de estabilização gradual da memória, pós-aquisição, a qual seria crucial para a manutenção da mesma ao longo do tempo. Prova disso, em 1882, Ribot já havia demonstrado que a probabilidade de memórias recentes sofrerem amnésia retrógrada por um trauma cerebral era maior do que em memórias mais remotas. Contudo, foi somente após o trabalho realizado por Müller e Pilzecker, em 1900, que a existência desse fenômeno foi aceita pela comunidade científica. Naquela ocasião, os autores demonstraram que interferências aplicadas logo após, mas não em um período mais distante no tempo, afetavam o aprendizado inicial em seres humanos. Essa observação indicava a existência de duas características importantes das memórias: a primeira delas é que, após a aquisição, as memórias necessitam de um processo gradual de estabilização ao longo do tempo; a outra característica refere-se ao fato de que esse processo ocorre em um intervalo limitado no tempo, durante o qual a memória é suscetível a interferências. A esse processo gradual de estabilização denominou-se **consolidação da memória** (do latim '*consolidare*', tornar concreto, fixo). Assim, com o passar do tempo, a memória é consolidada e armazenada no cérebro na forma de uma representação neural específica chamada de "traço de memória ou engrama", não sendo, nesse momento, mais suscetível a interferências (DUDAI, 2002) (**Figura 1**).

Nos últimos anos, os esclarecimentos acerca dos mecanismos fisiológicos que suportam a consolidação da memória vêm avançando muito rapidamente em decorrência do melhor entendimento das suas bases celulares e moleculares. Atualmente, sabe-se que o processo de consolidação envolve modificações e alterações plásticas nos circuitos neuronais que foram previamente recrutados no momento da aquisição da memória para sustentar o armazenamento dessas informações (McINTYRE *et al.*, 2012).

Figura 1. Representação esquemática das primeiras etapas de formação das memórias.



No momento da sua aquisição, a memória é temporariamente instável (lábil) e suscetível a interferentes, sejam eles fisiológicos, comportamentais ou farmacológicos. Para que essa memória se torne estável e, então, possa perdurar no cérebro, é necessária uma etapa gradual de estabilização (consolidação), a qual ocorre dentro de um intervalo de tempo limitado (janela temporal da consolidação). Por fim, após finalizado o processo de consolidação, a memória torna-se estável e, portanto, insensível a interferentes. Adaptado de Dudai (2004).

Assim, a seguir serão brevemente descritos os mecanismos de plasticidade neuronais considerados básicos para a formação das memórias.

1.1.2 Plasticidade neuronal envolvida na formação das memórias

A fim de que uma memória seja formada de maneira duradoura, se faz necessária a ocorrência de alterações neuroplásticas, as quais darão suporte a essa memória. Um dos principais mecanismos responsáveis por esse processo celular é referido atualmente como potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*). As bases para a existência da LTP foram fornecidas em 1949 pelo neurocientista canadense Donald Hebb, o qual propôs a existência de mecanismos de modificações sinápticas que, por induzirem um reforço dessas sinapses, sustentariam a formação da memória. Basicamente, a teoria de Hebb era de que sinapses ativadas de maneira

significativa por determinados estímulos poderiam ser remodeladas, de forma que a sua ativação geraria respostas de maior magnitude nos neurônios pós-sinápticos, um evento que poderia justificar a retenção das memórias (MILNER *et al.*, 1998; JOHANSEN *et al.*, 2011).

Anos mais tarde, a teoria de Hebb foi experimentalmente comprovada por Bliss e Lømo (1973). Esses autores demonstraram que a estimulação repetida de neurônios da via perforante de coelhos anestesiados eram capazes de aumentar o potencial excitatório de neurônios pós-sinápticos, levando a um aumento sustentado na eficiência da transmissão sináptica nas células granulares do giro denteado no hipocampo. A esse processo denominou-se LTP. Algumas décadas depois, por conta de processos celulares e moleculares análogos à consolidação da memória, a LTP foi proposta como o substrato fisiológico para a formação das memórias (BLISS, COLLINGRIDGE, 1993).

Desde a sua descoberta, os processos celulares e moleculares envolvidos na indução da LTP vêm sendo investigados. Atualmente, sabe-se que para a indução de LTP se faz necessária a ativação de receptores glutamatérgicos NMDA (N-metil D-Aspartato) e AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico) (HARRIS *et al.*, 1984; VOLIANSKIS, 2015). Em sequência, o influxo de cálcio resultante da ativação desses receptores leva ao recrutamento de vias intracelulares que induzem a síntese de fatores de transcrição (como a CREB - do inglês, *cAMP-responsive element binding protein*), fatores neurotróficos (como o BDNF - do inglês, *brain derived neurotrophic factor*) e também de novas proteínas responsáveis pelo remodelamento sináptico, como componentes estruturais (p. ex. a Arc – Arg3.1 - do inglês, *activity-regulated cytoskeletal protein*) e receptores de membrana (MIYAMOTO, 2006; PLATH *et al.*, 2006; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2014). Como consequência, ocorre um aumento da superfície sináptica e da densidade de receptores, os quais sustentam a potenciação duradoura na eficiência sináptica (LYNCH *et al.*, 2007). Esses processos plásticos envolvidos na LTP são comuns ao processo de consolidação da memória, incluindo a janela temporal necessária para a sua ocorrência. Logo, a LTP e a consolidação parecem refletir faces distintas de um mesmo evento (BLISS, COLLINGRIDGE, 1993; DUDAI, 2004).

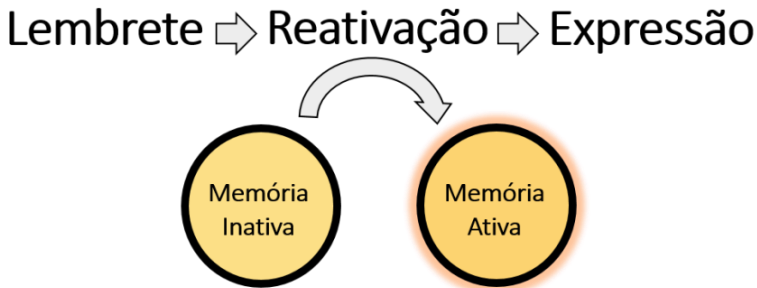
Por fim, é apropriado ressaltar que, embora ainda exista alguma controvérsia sobre a LTP como o mecanismo fisiológico que sustentaria as memórias ao longo do tempo, estudos *in vivo* vêm demonstrando uma relação direta entre a ocorrência do aprendizado e a indução de LTP (WHITLOCK *et al.*, 2006).

1.1.3 Acessando uma memória: o processo de evocação

Uma vez consolidada, uma informação previamente estabilizada e armazenada pode ser acessada mediante exposição a um estímulo lembrete. Esse processo dinâmico é denominado de evocação da memória. Do ponto de vista prático, a evocação pode ser o único indício ou prova da existência de uma memória (JAMES, 1890).

Em 1983, o psicólogo experimental e neurocientista cognitivista Endel Tulving propôs que o processo de evocação era composto por duas etapas: a reativação e a expressão (**Figura 2**). A reativação da memória é considerada 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 reexposição às pistas ou lembretes associados no momento do aprendizado. A segunda etapa da evocação de uma memória, a expressão, envolve a experiência subjetiva do lembrete e o desempenho correspondente (expressão comportamental). No entanto, é importante ressaltar que a etapa de reativação pode ocorrer sem a expressão da memória (LEWIS, 1979; LEE, FLAVELL, 2014).

Figura 2. Representação esquemática da etapa de evocação da memória.



A evocação é um processo complexo e bifásico que permite o acesso à informação previamente adquirida. Mediante um estímulo lembrete, uma memória pode ser reativada (primeira etapa da evocação da memória). A reativação consiste na passagem do traço de memória do seu estado inativo para o estado ativo, permitindo, então, a utilização da informação. Por fim, uma vez reativado, o traço poderá ou não ser traduzido na expressão de um comportamento que foi codificado no momento do aprendizado (segunda etapa da evocação da memória). Adaptado de Lewis (1979) e Lee e Flavell, (2014).

O fenômeno da reativação da memória constituiu um importante marco no campo de estudo das memórias por desafiar a até então bem aceita “teoria da consolidação”. Essa teoria postulava o estado fixo e imutável da memória, ou seja, uma memória já consolidada permaneceria no cérebro de maneira pouco mutável ou imutável (estado fixo da memória) e, neste caso, a evocação não passava de uma mera leitura passiva do aprendizado (DUDAI, 2004). No entanto, essa teoria foi duramente contestada quando se demonstrou que a reexposição de animais às pistas anteriormente associadas ao aprendizado inicial fornecia novamente um cenário propício para a modulação dessa memória. Nesse estudo, a aplicação de choques eletroconvulsivos após a sessão de reativação da memória foi capaz de induzir um estado de amnésia retrógrada (MISANIN *et al.*, 1968), sendo esse fenômeno inicialmente referido na literatura como “amnésia dependente de pista” (do inglês, *cue-dependent amnesia*). Assim, esses resultados sugeriam, pela primeira vez, que uma informação previamente

estável (consolidada) poderia novamente se tornar suscetível a modificações. A partir de então, o processo de evocação deixou de ser considerado como uma mera “leitura passiva” da informação armazenada e passou a ser visto como um evento capaz de desencadear um processo de desestabilização (processo que conduz a memória ao estado de labilidade) necessário para a modulação da memória pré-existente (DUDAI, 2002).

1.1.4 Reconsolidação da memória

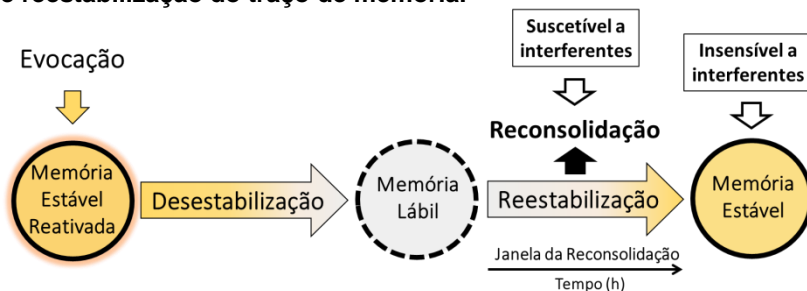
Como mencionado anteriormente, a “teoria da consolidação” foi desafiada quando Misanin e colaboradores (1968) demonstraram o fenômeno de “amnésia dependente de pista”. Resultados similares também foram relatados por outros grupos de pesquisadores, onde interferências capazes de prejudicar a consolidação de uma memória também se mostravam efetivas quando aplicadas imediatamente após a sua evocação (SCHNEIDER, SHERMAN, 1968; DEVIETTI, KIRKPATRICK, 1976; MACTUTUS *et al.*, 1979). Para explicar esse fenômeno, foi sugerido naquela época que, após a evocação, uma memória previamente consolidada poderia novamente se tornar instável, e, portanto, suscetível à modulação. Contudo, esses achados acabaram não recebendo a merecida atenção na época, uma vez que eles não conseguiam sustentar essa nova visão de que as memórias eram mais dinâmicas do que se pensava.

Longe do centro das atenções por quase 20 anos, o tema da reativação como forma de modulação da memória foi revivido por Przybylski e Sara (1997). Nesse trabalho, foi demonstrado que o antagonismo de receptores NMDA após a sessão de evocação era capaz de prejudicar a posterior retenção de uma memória espacial. Esses achados produziram grande impacto na comunidade científica, pois eles sustentavam não apenas a ideia de que as memórias poderiam novamente se tornar lábeis após a sua evocação, como também indicavam que um novo processo de estabilização (referido como reestabilização) era requerido para a manutenção dessa memória. Naquele momento, a expressão “amnésia dependente de pista” foi então substituída por um termo que destaca o processo de reestabilização que presumivelmente ocorre após a

desestabilização da memória pós-evocada: a "**reconsolidação**" (PRZYBYSLAWSKI, SARA, 1997; SARA, 2000) (**Figura 3**).

Nos anos 2000, esta "teoria da reconsolidação" foi consagrada após a pesquisa de Nader e colaboradores. Nesse estudo, os autores demonstraram que a microinfusão de anisomicina, um inibidor de síntese proteica, na região da amígdala basolateral (ABL) logo após a evocação da memória, mas não 6 h após, resultou em amnésia retrógrada no teste subsequente. Nenhuma alteração foi observada quando a anisomicina foi administrada na ausência de reativação da memória. Em conjunto, esses resultados reforçaram a então proposta "teoria da reconsolidação" e indicavam, pela primeira vez, que a reconsolidação era um processo gradual e limitado no tempo ("janela temporal da reconsolidação"), o qual era dependente da síntese proteica.

Figura 3. Representação esquemática da etapa de desestabilização e reestabilização do traço de memória.



Após a reativação, a memória pode novamente tornar-se lábil por um processo chamado de desestabilização. Este período lábil e suscetível a interferentes (sejam eles fisiológicos, comportamentais ou farmacológicos) é transitório, sendo gradualmente reestabilizado por um processo chamado de reconsolidação da memória. Esse processo ocorre dentro de um período de tempo limitado, referido como "janela temporal de reconsolidação". Após o término da reconsolidação, a memória novamente torna-se estável, e não mais suscetível a interferentes. Adaptado de Nader e colaboradores (2000) e Exton-McGuinness e colaboradores (2015).

Nos anos seguintes, a reconsolidação foi extensamente estudada e reproduzida em diversas espécies (incluindo em seres humanos), tarefas e regiões do cérebro através do uso de

agentes amnésicos e potencializadores (isto é, agentes capazes de fortalecer o traço de memória) (NADER *et al.*, 2000; ANOKHIN *et al.*, 2002; PEDREIRA *et al.*, 2002; EISENBERG *et al.*, 2003; SANGHA *et al.*, 2003; WALKER *et al.*, 2003; DACHER *et al.*, 2005). Contudo, alguns estudos não conseguiram alterar a memória após a sua evocação (CAMMAROTA *et al.*, 2004), indicando a existência de fatores que poderiam limitar (dificultar) a indução da desestabilização e, assim, impedir a ocorrência da reconsolidação da memória (LEE, 2009). Nesse sentido, várias “condições limitantes” (do inglês, *boundary conditions*) foram propostas, tais como a força (SUZUKI *et al.*, 2004) e a idade da memória (SUZUKI *et al.*, 2004; ALBERINI, 2005). Portanto, nem toda sessão de evocação resulta na desestabilização da memória (PEDREIRA *et al.*, 2004; BUSTOS *et al.*, 2009; FORCATO *et al.*, 2009; GISQUET-VERRIER, RICCIO, 2012; SEVENSTER *et al.*, 2012).

A redescoberta, e posterior ascensão, da reconsolidação levou muitos pesquisadores a se questionarem sobre o papel funcional desse processo. A esse respeito, tem sido proposto que a reconsolidação apresenta um papel altamente adaptativo para o organismo. Isso porque, a reconsolidação permite que uma memória já consolidada seja recalibrada ou reajustada mediante as necessidades impostas pelo ambiente, através da manutenção (TRONSON, TAYLOR, 2007; LEE, 2009; HARDT *et al.*, 2010), da adição de novas informações, do enfraquecimento ou do fortalecimento da memória (SARA, 2000; DUDAI, 2006; MORRIS *et al.*, 2006; LEE, 2010; DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2013).

Por fim, apesar de seu nome sugerir, a reconsolidação não é uma mera repetição do processo de consolidação. Embora ambos os processos apresentem mecanismos celulares e moleculares em comum, evidências recentes vêm demonstrando mecanismos plásticos específicos para cada um desses processos. Por exemplo, Lee e colaboradores (2004, 2008) demonstraram que, no hipocampo dorsal, ocorre uma dupla dissociação entre o gene de expressão imediata *Zif268* (do inglês, *Zinc finger protein*) e o fator de transcrição BDNF nos processos de reconsolidação e consolidação, respectivamente, em memórias aversivas contextuais. Essas conclusões foram baseadas na observação de que a microinfusão de *antisense* para BDNF resultava no prejuízo de retenção de um novo

aprendizado, enquanto que o aprendizado inicial era mantido. Por outro lado, a microinfusão de *antisense* para *Zif268* não prejudicava a aquisição de uma nova memória, porém prejudicava a reconsolidação da memória inicial.

1.1.5 Extinção da memória

Como já mencionado anteriormente, a evocação pode conduzir uma memória ao processo de reconsolidação. Mais do que isso, a evocação também pode conduzir uma memória a outro processo temporalmente distinto, a extinção (SUZUKI *et al.*, 2004).

A extinção da memória foi inicialmente descrita por Ivan Pavlov (1927). Naquela ocasião, Pavlov observou que os animais que passavam por reexposições prolongadas ou sucessivas a um estímulo previamente condicionado diminuam temporariamente a expressão da resposta condicionada. A esse processo denominou-se extinção da memória (VAN ELZAKKER *et al.*, 2014). No entanto, apesar do termo sugerir, a extinção não resulta no apagamento ou eliminação da memória original, e sim na supressão temporária da sua expressão comportamental (QUIRK *et al.*, 2010). Nesse sentido, a extinção desempenha importante papel na flexibilidade da expressão comportamental (SOTRES-BAYON, QUIRK, 2010).

Visto que uma das principais características da extinção é a supressão temporária da expressão da resposta condicionada, é esperado que a expressão dessa resposta retorne em algum momento. Em modelos animais, o retorno da resposta condicionada ocorre (1) pelo “simples” passar do tempo (referido como recuperação espontânea) (BOUTON, 2006), (2) pela exposição a um segundo evento aversivo (referido como reinstalação) (BOUTON, BOLLES, 1979; WESTBROOK, 2002) ou (3) pelo contato com componentes associados ao aprendizado inicial que não foram extintos (referido como renovação) (BOUTON, RICKER, 1994). Nas três condições mencionadas acima, o retorno da expressão da resposta condicionada parece ser ocasionado pela ativação (ou desinibição) do conjunto neuronal que suporta a memória original (BOUTON, 2006). Em resumo, essas características permitem o estudo do processo de extinção da memória, além de poderem

ser usadas como ferramentas para dissociar o processo de reconsolidação do de extinção.

1.1.6 Generalização comportamental

A generalização pode ser definida como a associação e expressão de respostas comportamentais relacionadas a determinado estímulo (pista ou contexto) em resposta a estímulos que sejam diferentes, porém semelhantes àqueles presentes na experiência original (HUCKLEBERRY *et al.*, 2016). Do ponto de vista fisiológico, a generalização é um fenômeno altamente adaptativo, pois ela permite o acesso às informações previamente aprendidas para guiar a escolha de comportamentos adequados frente a situações que sejam similares às experiências já vivenciadas, já que os estímulos não ocorrem exatamente da mesma forma na natureza (DUNSMOOR, PAZ, 2015; HUCKLEBERRY *et al.*, 2016).

Um dos relatos mais antigos acerca da generalização foi fornecido por Ivan Pavlov, em 1927. Basicamente, ele observou que a salivação de cães em resposta a um estímulo sonoro específico, poderia ser provocada também por estímulos sonoros de outras frequências que nunca haviam sido associados ao recebimento de alimento. Mais tarde, Lashley e Wade (1946) cunharam o termo “generalização” para descrever esse fenômeno. A partir de então, uma série de estudos vem tentando caracterizar a generalização. Nesse sentido, grandes contribuições foram fornecidas por Guttman e Kalish (1956) quando eles demonstraram em pombos a existência de um gradiente de generalização: pombos inicialmente condicionados a luzes com comprimentos de onda específicos apresentavam um grau de resposta condicionada que era indiretamente proporcional à diferença entre o comprimento de onda condicionado e o apresentado. Esse achado indicou que o grau de resposta generalizada para estímulos novos dependia da similaridade entre o estímulo novo e o estímulo inicial. Adicionalmente, os autores mostraram que a generalização da resposta não dependia da capacidade de distinção sensorial entre as pistas apresentadas, sugerindo que a generalização não resulta de uma mera falha de discriminação sensorial de estímulos. Atualmente, estudos de imagem em humanos reforçam essa premissa de que a generalização não é um

fenômeno passivo, mas sim um fenômeno ativo que depende da ação orquestrada de diversas regiões encefálicas em um sistema de decisão complexo baseado em ambiguidade e incerteza (ONAT, BÜCHEL, 2015).

Embora a generalização não seja uma propriedade exclusiva das memórias aversivas, tem sido demonstrado que as memórias formadas por estímulos com caráter aversivo elevado têm maior tendência de generalização (PITMAN, 1989; GHIRLANDA, ENQUIST; 2003; DUNSMOOR, MURPHY; 2015). Do ponto de vista adaptativo, essa relação é extremamente importante no sentido de garantir a manutenção e a sobrevivência do indivíduo (DUNSMOOR, PAZ, 2015; HUCKLEBERRY *et al.*, 2016). Por outro lado, tão importante quanto generalizar para garantir a integridade do indivíduo, é limitar a generalização para evitar que respostas comportamentais inapropriadas sejam expressas na presença de situações muito diferentes daquela da experiência original, condição definida na literatura como *overgeneralization* (supergeneralização, em termos quantitativos e/ou qualitativos) (DUNSMOOR, PAZ, 2015). Nesse contexto, é importante ressaltar que o grau de especificidade (ou generalização) é influenciado pela intensidade da experiência aversiva que desencadeia o aprendizado. Por exemplo, em roedores, o aumento na intensidade do condicionamento aversivo resulta no aumento da probabilidade do animal expressar uma resposta defensiva generalizada frente a pistas não associadas (GHOSH, CHATTARJI, 2015).

Por fim, a generalização comportamental é um fenômeno que pode ser rapidamente induzido e observado em animais experimentais através de manipulações farmacológicas (GAZARINI *et al.* 2014), ou ainda ser observado como um fenômeno temporal, nesse caso possivelmente refletindo o processo de “consolidação sistêmica” da memória. A consolidação sistêmica tem sido descrita como um processo de reorganização estrutural, no qual a importância relativa do hipocampo em suportar um traço de memória com alta especificidade contextual vai sendo reduzida com o passar do tempo, ao passo que a importância do córtex pré-frontal, uma região com menor especificidade contextual, seria aumentada (WINOCUR *et al.*, 2007; GOSHEN *et al.*, 2011).

1.2 ESTUDANDO A NEUROBIOLOGIA DAS MEMÓRIAS AVERSIVAS: O CONDICIONAMENTO AVERSIVO CONTEXTUAL

No campo da pesquisa das memórias aversivas, o paradigma do condicionamento aversivo contextual (CAC) tem se mostrado uma ferramenta muito útil, uma vez que este protocolo permite o estudo da dinâmica e da neurobiologia das memórias aversivas em condições relativamente controladas em animais de laboratório.

Embora o CAC seja comumente referido como condicionamento Pavloviano, alguns grupos já estudavam alterações comportamentais em ratos muito antes do trabalho clássico de Ivan Pavlov (1927) (CARR, WATSON, 1908), incluindo estudos com a aplicação de choques elétricos (estímulo aversivo utilizado até os dias de hoje para produzir condicionamento) (VINCENT, 1915). Mais tarde, os achados provenientes desses e de outros estudos foram integrados aos conceitos de Pavlov para o estabelecimento deste que conhecemos hoje como paradigma do CAC (FORBES, 1935; MOWRER, MILLER, 1942; DEXTER, MERRILL, 1969).

O CAC baseia-se no pareamento ou associação entre um estímulo emocionalmente neutro (estímulo neutro - EN; p. ex.: contexto) com um estímulo biologicamente relevante (estímulo incondicionado - EI; p. ex.: choque elétrico nas patas). Uma vez associados, o EN passa agora a ser interpretado como um estímulo condicionado (EC) capaz de induzir a expressão de respostas condicionadas. No caso do CAC, a expressão da resposta de congelamento frente ao EC é comumente usada para inferir o índice de aprendizado dessa tarefa, ou seja, de retenção da memória (BLANCHARD, BLANCHARD, 1969).

Uma das grandes vantagens desse protocolo é que o EI pode ser ajustado previamente de acordo com a hipótese de trabalho. Por exemplo, o aumento no número (GAZARINI *et al.*, 2014) ou na intensidade dos choques elétricos (BALDI *et al.*, 2004) se correlaciona positivamente (pelo menos até se atingir o platô da curva de aprendizado) com os níveis de expressão da resposta de congelamento. Nesse sentido, protocolos de condicionamento considerados fracos (p. ex.: 1 choque de 0,4 mA) ou intermediários (p. ex.: 1 choque de 0,7 mA) são comumente adotados para produzir um baixo nível de

congelamento. Essa estratégia permite, por exemplo, otimizar a visualização de manipulações cujo objetivo é o de facilitar a formação da memória (MALDONADO *et al.*, 2011).

Um fato que reforça ainda mais a utilidade do protocolo de CAC como uma importante ferramenta no estudo das memórias aversivas é que os eventos temporalmente orquestrados, que ocorrem antes, durante ou após a sessão de condicionamento, estão intimamente relacionados às diferentes etapas da formação e da manutenção da memória aversiva. Assim, é na sessão de condicionamento que ocorre a **aquisição** da informação (pareamento do EC + EI). A **consolidação** compreende o processo gradual que se inicia durante a sessão de condicionamento e que se estende por algumas horas. Durante essa "janela temporal de consolidação" a informação está lábil e, portanto, suscetível à modulação endógena (p. ex: por hormônios do estresse) ou exógena (p. ex: por agentes farmacológicos), com impacto direto na estabilização do traço de memória em formação (McGAUGH, 2000). Portanto, para o estudo da etapa de consolidação da memória, as manipulações farmacológicas são habitualmente realizadas imediatamente após a sessão de condicionamento. A **evocação (reativação da memória)** no CAC seria desencadeada pela reexposição do animal ao contexto pareado. Finalmente, após a evocação, a memória poderá labilizar (dependendo das condições experimentais), permitindo assim o estudo da etapa de **desestabilização** e, posteriormente, da **reconsolidação**. Assim, as manipulações farmacológicas que visam interferir com a etapa de reconsolidação são habitualmente realizadas imediatamente após a sessão de reativação da memória. Por fim, o fenômeno de **generalização** pode ser estudado no CAC a partir da exposição do animal a um contexto não pareado ao EI e com a análise subsequente dos níveis da resposta condicionada (p. ex.: congelamento) expressa nesse ambiente.

Em relação aos substratos neuronais que suportam o CAC, tem sido demonstrado que regiões cerebrais, como o córtex pré-frontal, a amígdala, o hipocampo, o núcleo *reuniens* do tálamo e a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), fazem parte de um circuito múltiplo de estruturas recrutadas no processamento das memórias aversivas (MAREN *et al.*, 2013; ROZESKE *et al.*, 2014; TROYNER *et al.*, 2018). Diversas vias neuronais presentes nessas regiões formam conexões diretas ou indiretas que

sustentam e participam ativamente das etapas de formação e manutenção da memória aversiva (BANNERMAN *et al.*, 2014).

Embora a contribuição relativa de cada uma dessas estruturas já tenha sido relatada (embora longe de serem totalmente elucidadas) no paradigma do CAC, atenção especial é direcionada para o hipocampo, uma vez que, por se tratar de uma memória contextual, a participação dessa região cerebral já está bem demonstrada (embora longe de ser totalmente elucidada) (PHILLIPS, LEDOUX, 1992; FANSELOW, 2000).

1.3 O HIPOCAMPO, AS MEMÓRIAS E OS NEUROPEPTÍDEOS

O hipocampo é uma região cerebral que está associada ao processamento de aspectos cognitivos e emocionais (MOSER *et al.*, 1995; KJELSTRUP *et al.*, 2002; POTHUIZEN *et al.*, 2004). Esse envolvimento dual do hipocampo seria possível em função da dissociação anatômica e funcional ao longo do seu eixo longitudinal. Enquanto os processos emocionais em roedores são mais relacionados à porção ventral (hipocampo ventral, HV) (região homóloga ao hipocampo anterior em primatas), o hipocampo dorsal (HD) (região homóloga ao hipocampo posterior em primatas) é tipicamente relacionado ao processamento das memórias (FANSELOW, DONG, 2010). As diferenças funcionais dessas duas regiões podem ser sustentadas pelo perfil de conectividade distinto dessas regiões com outras estruturas cerebrais, bem como por diferenças na expressão gênica e nos marcadores moleculares (FANSELOW, DONG, 2010).

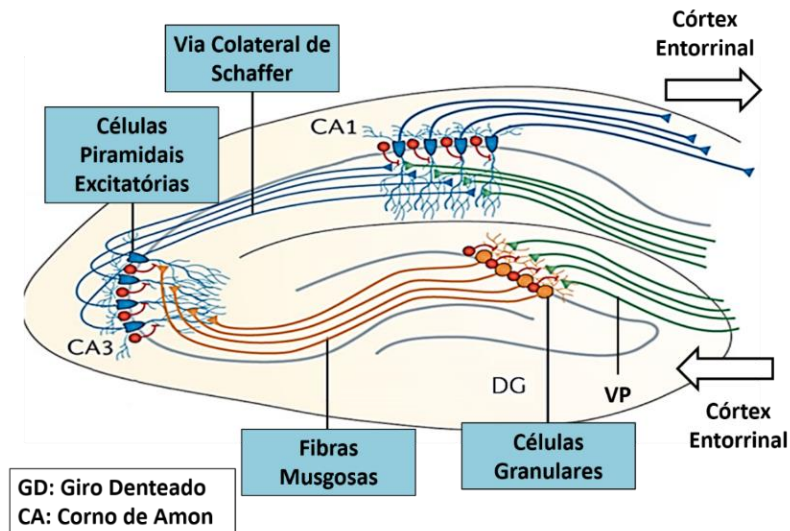
Quanto às conexões, o HD envia projeções para estruturas corticais, especialmente aos córtices retrosplenial e cingulado anterior (ambos envolvidos com funções de navegação espacial, de aprendizado e memória (CENQUIZCA, SWANSON, 2007), enquanto recebe informações oriundas dos córtices visual, auditório e sensoriais, primário e secundário, através do córtex entorrinal medial (o que justifica seu papel na codificação de pistas contextuais e no processamento das memórias) (MOSER, MOSER, 1998). Adicionalmente, o HD também se conecta indiretamente (via córtex entorrinal e perirrinal) com o córtex pré-frontal medial (CPFm) e a amígdala (PITKÄNEN *et al.*, 2000; VERTES, 2006; FANSELOW, DONG, 2010; TANAKA *et al.*, 2014). Essas conexões podem justificar o envolvimento de eventos emocionais na potencialização do processo de

consolidação e/ou reconsolidação das memórias aversivas (MALIN, MCGAUGH, 2006; BANNERMAN *et al.*, 2014). Por sua vez, o HV projeta diretamente para o CPFm e a amígdala (JAY, WITTER, 1991; KISHI *et al.*, 2006), o que explica de alguma forma seu papel modulatório sobre os processos emocionais.

O hipocampo foi descrito no século XV pelo anatomista e cirurgião italiano Julius Caesar Arantius, o qual também cunhou o termo “hipocampo” pela primeira vez (do grego, *hippos* ["cavalo"] e *kamos* ["monstro marinho"]). No entanto, descrições detalhadas da citoarquitetura do hipocampo foram fornecidas somente no século XX por Santiago Ramón y Cajal e Raphael Lorente de Nó, através do refinamento da técnica de coloração por sais de prata empregada por Camillo Golgi (FAIRÉN, 2007). Essa técnica permitiu então revelar detalhes da estrutura neuronal dessa região sob o microscópio. A partir de então, Lorente de Nó propôs três subdivisões para o hipocampo baseado nos padrões de conectividade, atribuindo a elas o nome de Corno de Amon 1, 2 e 3 (CA1, CA2 e CA3, respectivamente) (FAIRÉN, 2007).

A grande capacidade de processamento de memória atribuída à formação hipocampal (composta pelas três sub-regiões anteriormente citadas, além do giro denteado, subículo e córtex entorrinal; SCHULTZ, ENGELHARDT, 2014) deve-se, em parte, a existência do circuito trisináptico dessa região. Esse circuito permite alta eficiência na recepção e gerenciamento de informações (NEVES *et al.*, 2008). Para fins didáticos, esse circuito pode ser simplificado descrito da seguinte maneira: **(1)** através da via perforante, o córtex entorrinal (região medial) envia projeções que transmitem informações sensoriais (oriundas dos córtices visual, auditório e sensorial primário e secundário) às células granulares do giro denteado (GD) (MOSER, MOSER, 1998). Por sua vez, **(2)** o GD envia suas projeções axonais (que compõem as fibras musgosas) para as células piramidais presentes na região CA3, **(3)** que então as retransmitem para a região CA1 via projeções colaterais de Schaffer. Após processada, a informação é então enviada a outras regiões, tal como o próprio córtex entorrinal (via região medial e lateral) (ANDERSEN *et al.*, 2007) (**Figura 4**).

Figura 4. Representação esquemática da estrutura hipocampal.



Circuito trisináptico do fluxo intrínseco de informação no hipocampo dorsal. VP, via perforante. Adaptado de Moser e Moser (1998), Neves *et al.* (2008) e Dierssen (2012).

Para que uma memória seja formada, se faz necessária a ocorrência de eventos plásticos, as quais irão codificar e suportar essa memória ao longo do tempo. Um dos principais processos de plasticidade celular envolvidos é a já mencionada LTP. Sabe-se que para a ocorrência desse processo é essencial a participação de neurotransmissores clássicos, tal como o glutamato (HARRIS *et al.*, 1984; VOLIANSKIS, 2015). Entretanto, o envolvimento de outras moléculas, como por exemplo, os neuromoduladores peptídicos, também se faz necessário para fornecer um “ajuste fino” dos processos plásticos envolvidos na formação e manutenção de memórias (OGREN *et al.*, 2010).

O conceito de neuropeptídeos (NPs), como peptídeos com atividade neurogênica, foi primeiramente proposto por David de Wied na década de 1960. Em seus estudos, de Wied demonstrou que animais hipofisectomizados apresentavam prejuízo de aprendizado, sendo essa condição revertida pelo tratamento crônico com um polipeptídeo chamado de hormônio adrenocorticotrópico que restaurou essa condição (DE KLOET,

1987). A partir de então, deu-se início às investigações sobre o papel dessas moléculas sobre as funções cognitivas.

Visto que a expressão dos NPs e seus receptores ocorre em praticamente todo o encéfalo, já seria esperado que essas substâncias também pudessem influenciar os processos relacionados ao aprendizado e à memória (BORBÉLY *et al.*, 2013). Contudo, diferentemente dos neurotransmissores clássicos, os NPs parecem ser requeridos principalmente em situações de estresse mais intensas, tal como ocorre durante uma experiência aversiva (SHIRAYAMA *et al.*, 2004; OGREN *et al.*, 2010). De fato, tem sido relatado o envolvimento desses peptídeos no processamento das memórias com conteúdo emocional negativo (OGREN *et al.*, 2010). Nesses casos, os efeitos dessas substâncias são atribuídos a um processo modulatório sobre a neurotransmissão clássica, uma vez que ambas as substâncias coexistem na maioria dos neurônios (LUNDBERG, 1983; OGREN *et al.*, 2010).

Nesse contexto, evidências têm surgido acerca do papel da dinorfina, um neuropeptídeo opioide, e seu receptor de maior afinidade, o receptor κ opioide (κ OR) (CHAVKIN *et al.*, 1982). Além do fato de ambos já terem sido identificados em regiões cerebrais envolvidas no processamento e na manutenção de memórias, como no hipocampo (ZUKIN *et al.*, 1988; UNTERWALD *et al.*, 1991), a ativação dos κ ORs pela dinorfina é capaz de reduzir a excitabilidade dessa região (WAGNER *et al.*, 1992; SIMMONS, CHAVKIN, 1996), bem como de inibir a indução de LTP (WAGNER *et al.*, 1993). Assim, esses dados sugerem um papel modulatório inibitório mediado por esses receptores sobre os processos de aprendizado e memória. Essa sugestão também é suportada pelo fato de que a dinorfina pode ser armazenada e coliberada com o glutamato (TERRIAN *et al.*, 1988; GANNON, TERRIAN, 1991; CONNER-KERR *et al.*, 1993), condição em que exerce um efeito inibitório sobre a ação e a liberação do mesmo (SIMMONS *et al.*, 1994). Aliado a isso, níveis elevados de dinorfina foram observados no hipocampo de ratos após protocolos envolvendo experiências aversivas (SHIRAYAMA *et al.*, 2004), o que torna os HD κ ORs (receptores κ opioides presentes na região do hipocampo dorsal) potenciais candidatos para modular memórias aversivas.

Nesse momento, um melhor entendimento acerca dos κ ORs e dos demais elementos que compõe esse sistema

denominado de “sistema dinorfinérgico” se faz necessário para podermos avançar com esse tema.

1.4 SISTEMA DINORFINÉRGICO

Na década de 70, Goldstein e colaboradores (1979) descreveram as propriedades de um peptídeo opioide que possuía 13 aminoácidos (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys), o qual anteriormente já havia sido isolado a partir da pituitária de porco (COX *et al.*, 1975; TESCHEMACHER *et al.*, 1975). Para denotar a sua extraordinária potência, esse peptídeo foi chamado de dinorfina A₁₋₁₃ (do inglês, *dynorphin*; prefixo “*dyn*” do grego *dynamis* que significa poder/força e o sufixo “*orphin*” indica que é de natureza opioide). Mais tarde, uma sequência completa contendo 17 resíduos de aminoácidos foi identificada (GOLDSTEIN *et al.*, 1981), sendo esse peptídeo chamado de dinorfina A₁₋₁₇. Uma forma bioativa ainda menor da dinorfina A, a dinorfina A₁₋₈, também foi descrita (MINAMINO *et al.*, 1980). Por fim, também foram identificados outros dois peptídeos, posteriormente chamados de dinorfina B₁₋₁₃ - rimorfina - e dinorfina B₁₋₂₉ - leumorfina.

No sistema nervoso central (SNC), as dinorfinas são sintetizadas nos neurônios pré-sinápticos a partir de um precursor proteico biologicamente inativo chamado pró-dinorfina (248 aminoácidos) (**Figura 5**) (WATSON *et al.*, 1983). Após uma série de reações enzimáticas mediadas por endopeptidases (convertases de pró-hormônios do tipo 1 e tipo 2), as dinorfinas A e B são formadas. Em seguida, esses peptídeos são armazenados em vesículas grandes de “centro denso” (CHO, BASBAUM, 1989; DRAKE *et al.*, 1994), podendo ser liberados em resposta a uma atividade neuronal sustentada (WEISSKOPF *et al.*, 1993). Após liberada, a dinorfina pode interagir com os κ ORs (*para mais detalhes do receptor, ver adiante*) localizados na pré- e pós-sinapse, ou ainda ter sua atividade limitada mediante a ação de enzimas de degradação chamadas de aminopeptidases-N (TURNER, 1998). Essas metalopeptidases são capazes de remover o grupo tirosina contido na porção N-terminal da estrutura peptídica da dinorfina, o qual é essencial para a ação opioide mediada por esse peptídeo (SCHWARTZ *et al.*, 1981; DUA *et al.*, 1985).

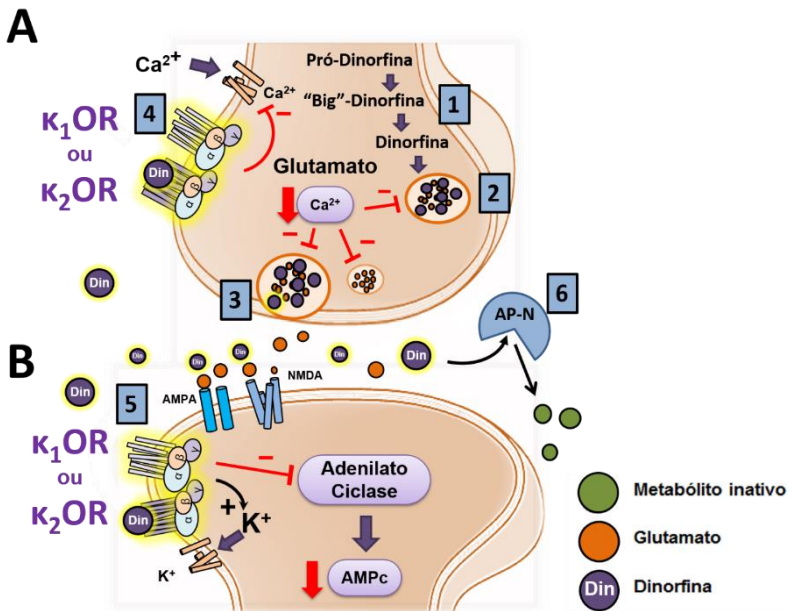
Em paralelo à descoberta da dinorfina, foi proposta a existência dos receptores para a própria dinorfina e demais opioides a partir de observações de compostos alcaloides que eram capazes de ligar-se com alta afinidade em membranas provenientes de tecido cerebral (PERT, SNYDER, 1973; SIMON *et al.*, 1973; TERENIUS, 1973). Mais tarde, Martin e colaboradores (1976) propuseram uma nomenclatura para esses receptores opioides com base na seletividade dos seus ligantes preferenciais. Assim, os receptores que possuíam alta capacidade de ligação com a morfina ficaram conhecidos como receptores μ opioides, enquanto que os que foram sensíveis à ligação da droga cetociclazocina (do inglês, *ketaciclazocine*) foram denominados de receptores κ opioides. Por último, os receptores δ opioides foram farmacologicamente identificados pela sua alta afinidade por encefalinas (LORD *et al.*, 1977). Posteriormente, com o advento da tecnologia de DNA recombinante, tornou-se possível a clonagem e a caracterização dos genes referentes aos diferentes receptores opioides, incluindo o dos κ ORs. O gene que codifica os receptores δ opioides foi o primeiro a ser clonado e, poucos anos após, os genes que codificam os receptores μ e κ opioides também foram clonados em ratos (CHEN *et al.*, 1993a; CHEN *et al.*, 1993b) e em humanos (MANSSON *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1994). Por fim, foi observado que esses receptores opioides apresentam grande homologia entre ratos e humanos. Por exemplo, os κ ORs expressos em ratos apresentam 94% de homologia com os κ ORs expressos em humanos, o que justifica o estudo em roedores, do ponto de vista translacional devido a sua possível aplicação clínica.

Os κ ORs pertencem à classe dos receptores metabotrópicos acoplados preferencialmente a uma proteína $G_{i/o}$. Os mecanismos de transdução de sinal referentes à ativação desses receptores ainda não estão completamente elucidados. No entanto, como todos os receptores opioides, a ativação dos κ ORs pela dinorfina pode ser dividida em um processo de dois estágios: um estágio inicial de ativação de cinase dependente de ligante e um estágio subsequente dependente da cinase 3 de receptores acoplados a proteína G (GRK3)/arrestina, o qual resulta na internalização e regulação negativa do receptor (do inglês, *dowregulation*) (BRUCHAS, CHAVKIN, 2010). No primeiro estágio, a interação da dinorfina com o κ OR recruta a $G_{\alpha i}$, a qual

inibe a produção de AMPc, via inibição da adenilato ciclase (TAUSSIG *et al.*, 1993), e ativa vias de sinalização relacionadas com as cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), tais como a ERK1/2 precoce, a *c-Jun N-terminal* e a *p38* (BRUCHAS, CHAVKIN, 2010). A ativação inicial dos κ ORs também recruta a $G\beta\gamma$, que, por sua vez, desempenha um papel inibitório neuronal através da ativação direta dos canais para K^+ de retificação interna (HENRY *et al.*, 1995) e da inibição da abertura dos canais para Ca^{2+} voltagem-dependentes (RUSIN *et al.*, 1997). Por outro lado, após a ativação prolongada, ou seja, no segundo estágio, o κ OR torna-se fosforilado devido ação da GRK-3 (APPLEYARD *et al.*, 1999), fato que permite a subsequente ligação do receptor com a arrestina (LOHSE *et al.*, 1992). Em sequência, o complexo κ OR-arrestina recruta fatores de transcrição *downstream*, tais como a *pCREB* (CREB na sua forma fosforilada) pela via da ERK 1/2 tardia (BRUCHAS, CHAVKIN, 2010) e o *zif268* pela via da *p38* (BRUCHAS *et al.*, 2006). No núcleo *accumbens*, por exemplo, a ativação da via κ OR-pCREB é implicada na regulação da expressão do gene que codifica a pró-dinorfina (CARLEZON *et al.*, 2005) e na promoção de efeitos do tipo pró-depressivos. Por outro lado, a ativação da via κ OR-p38 é requerida, por exemplo, em neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral para gerar aversão condicionada por lugar. Por fim, o κ OR tem sua atividade limitada mediante a sua internalização (LOH *et al.*, 2017).

Até o momento, pelo menos dois tipos de κ ORs já foram identificados com base em estudos de ligação, autoradiografia e estudos comportamentais: os receptores κ_1 opioides (κ_1 ORs) e os receptores κ_2 opioides (κ_2 ORs) (NOCK *et al.*, 1988; ZUKIN *et al.*, 1988; CLARK *et al.*, 1989). Diferentemente dos κ_1 ORs, os quais são produtos do gene receptor opioide kappa 1 (Oprk1; do inglês *opioid receptor kappa 1*), os κ_2 ORs foram propostos como heterodímeros formados pelos produtos gênicos do Oprk1 e do receptor opioide delta 1 (Oprd1; do inglês, *opioid receptor delta 1*) (MENG *et al.*, 1993; SIMONIN *et al.*, 1995).

Figura 5. Esquema geral da circuitaria clássica que envolve os κ ORs e a dinorfina.



Representação de uma fenda sináptica com neurônios (A) pré e (B) pós-sinápticos. No esquema, podem ser observados (1) a síntese, (2) o armazenamento, (3) a liberação vesicular, a localização dos receptores κ opioides (4) na pré-sínapse e (5) na pós-sínapse e (6) a enzima de degradação da dinorfina. κ_1 OR, receptor κ_1 opioide; κ_2 OR, receptor κ_2 opioide; AP-N, aminopeptidase-N; AMPA, receptor AMPA para o glutamato; NMDA, receptor NMDA para o glutamato; AMPc, adenosina monofosfato cíclico. Adaptado de NOCK *et al.* (1988), ZUKIN *et al.* (1988), CLARK *et al.* (1989), CONNER-KERR *et al.* (1993), TAUSSIG *et al.* (1993), HENRY *et al.* (1995), RUSIN *et al.* (1997), TURNER (1998) e CHAVKIN (2013). A base da figura foi extraída da plataforma comercial mindthegraph®.

1.4.1 Receptor κ opioide hipocampal nos processos de aprendizado e memória

Experimentos *in vitro* e *in vivo* têm sugerido que a ativação dos κ ORs do hipocampo promove um efeito modulatório negativo sobre o processamento da memória, embora algumas divergências entre linhagens e espécies tenham sido

encontradas. Estudos iniciais *in vitro*, realizados em fatias hipocampais de cobaias, demonstraram que a ativação dos κ ORs pela dinorfina diminuiu significativamente a excitabilidade hipocampal (WAGNER *et al.*, 1992; SIMMONS, CHAVKIN, 1996) e também prejudicou a indução da LTP (WAGNER *et al.*, 1993). Por outro lado, o antagonismo seletivo dos κ ORs pela *nor*-binaltorfimina (*nor*-BNI) facilitou a LTP nessa estrutura (WEISSKOPF *et al.*, 1993). Em contraste, o bloqueio dos κ ORs em fatias hipocampais de ratos não foi capaz de afetar a LTP (BRAMHAM, SARVEY, 1996). Além disso, a ativação desses receptores também não teve efeito sobre os potenciais excitatórios pós-sinápticos dependendo da linhagem dos ratos testadas (SALIN *et al.*, 1995), embora tenha sido capaz de reduzir a liberação de glutamato em sinaptossomas (CONNER-KERR *et al.*, 1993).

Contudo, apesar dos resultados *in vitro* serem aparentemente contraditórios entre as espécies, estudos comportamentais *in vivo* têm ajudado a esclarecer o papel dos HD κ ORs de ratos. Assim, tem sido sugerido que a ativação desses receptores prejudica o aprendizado espacial em ratos. Essa sugestão é sustentada pelos achados de SANDIN e colaboradores (1998) em que a microinfusão de dinorfina na região CA3 do HD inibiu o aprendizado no paradigma do labirinto aquático de Morris. Além disso, a microinfusão do agonista seletivo de κ ORs, o U-50,488H, na região CA3 do HD resultou em menor expressão da resposta de congelamento em camundongos no paradigma do CAC (DAUMAS *et al.*, 2007). Em ambos os estudos supracitados, o efeito dos agonistas foi prevenido pela administração prévia de *nor*-BNI (DAUMAS *et al.*, 2007). Curiosamente, a microinfusão isolada de *nor*-BNI, *per se*, não produziu qualquer alteração nesses dois paradigmas experimentais, o que parece ser conflitante com achados anteriores de Shirayama e colaboradores (2004) que indicavam a participação dos κ ORs em experiências aversivas. Esses resultados levantaram a possibilidade de que a intensidade de uma experiência aversiva poderia ser crítica para o recrutamento dos HD κ ORs nos processos mnemônicos. Além disso, a contribuição dos diferentes tipos de κ ORs presentes no HD de ratos (κ_1 ORs e κ_2 ORs) na consolidação e reconsolidação da memória aversiva contextual em ratos permanece a ser investigada.

2 HIPÓTESE

Em meio a esse cenário de achados contraditórios e incompletos, levantamos a hipótese de que a microinfusão do antagonista dos κ ORs no hipocampo dorsal de ratos potencializa a consolidação e a reconsolidação de memórias aversivas contextuais intensas e generalizadas, ao passo que a microinfusão do agonista dos κ ORs exerce um papel oposto sobre essas mesmas etapas, sendo a intensidade da experiência associativa aversiva crítica para o envolvimento desses receptores.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o papel dos κ ORs no hipocampo dorsal de ratos sobre a consolidação e a reconsolidação da memória aversiva contextual, utilizando protocolos de condicionamento aversivo contextual de diferentes intensidades.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs na consolidação da memória após o CAC de intensidade moderada;
- Analisar os efeitos do CAC moderado na imunomarcagem de HD κ ORs durante a consolidação da memória;
- Avaliar o efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs sobre os níveis de BDNF no HD durante a consolidação da memória no protocolo de CAC moderado;
- Investigar o efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs na consolidação da memória após diferentes intensidades de CAC (CAC forte e CAC fraco);
- Avaliar o efeito do agonista dos κ_1 ORs e κ_2 ORs na consolidação da memória no protocolo de CAC forte;
- Analisar o efeito do agonista dos κ_1 ORs e κ_2 ORs sobre os níveis de BDNF no HD durante a consolidação da memória no protocolo de CAC forte;
- Avaliar o efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs na reconsolidação da memória após diferentes intensidades de CAC (CAC moderado e CAC forte);
- Investigar o efeito do agonista dos κ_2 ORs na reconsolidação da memória no protocolo de CAC forte;

- Avaliar o efeito do agonista dos κ_2 ORs na reconsolidação da memória após um CAC forte utilizando o protocolo de reinstalação;
- Analisar o efeito do agonista dos κ_2 ORs e da microinfusão do antagonista dos κ ORs no teste de borrifagem com sacarose.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar machos (criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC) com idade entre 14 e 16 semanas (300-330g). Os animais foram agrupados em caixas de polipropileno (5 animais/caixa ou 3 animais/caixa para animais *naïve* ou operados, respectivamente) em ambiente com temperatura controlada (22 ± 1 °C) e ciclo claro/escuro de 12 h, com as luzes acesas às 7 h. A comida e a água foram fornecidas *ad libitum*.

O Comitê de Ética para o Uso de Animais de Laboratório da UFSC (CEUA-UFSC) aprovou todos os procedimentos experimentais realizados: CEUA-UFSC-PP0798/PP9771. Os procedimentos também estão em conformidade com o Guia do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NIH No. 80- 23, 1996). Todos os testes comportamentais foram realizados durante a fase clara do ciclo claro/escuro. Todos os cuidados foram tomados para minimizar o sofrimento e reduzir o número de animais utilizados.

4.2 DROGAS

O antagonista seletivo de κ ORs, o dihidrocloridrato de *nor*-binaltorfinina (TAKEMORI *et al.*, 1988) (*nor*-BNI; 0,3, 1,0, 3,0 e 10,0 nmol/0,5 μ L/hemisfério; Sigma-Aldrich, EUA), e o agonista seletivo de κ_2 ORs, o GR 89696 fumarato (BUTELMAN *et al.*, 2001) (0,1, 0,3 e 1,0 nmol/0,5 μ L/hemisfério; Tocris, EUA), foram dissolvidos em PBS contendo 10% de DMSO (Vetec, Brasil). O agonista seletivo de κ_1 ORs, o U-69593 (ZUKIN *et al.*, 1988) (0,1, 0,3, 1,0 e 30,0 nmol/0,5 μ L/hemisfério; Sigma-Aldrich, EUA), foi inicialmente diluído em PBS contendo 2% de HCl 0,1N e, posteriormente, neutralizado com NaOH a um pH próximo de 7,0. Finalmente, o antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, o cloridrato de ioimbina (IOI; 2,0 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA) foi dissolvido em NaCl a 0,9% e administrado sistemicamente (i.p.) em um volume de 1,0 ml/kg. Todas as concentrações e doses foram baseadas em experimentos pilotos realizados em nosso laboratório.

4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA, PROCEDIMENTO DE MICROINFUSÃO DAS DROGAS E HISTOLOGIA

Os animais foram anestesiados com uma injeção i.p. contendo uma mistura anestésica de xilazina (10 mg/ml; Carlier, Brasil) e cetamina (100 mg/ml; Sespo, Brasil) em um volume de 1,0 ml/kg. Após anestesiados, os animais foram então posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA) com o suporte de duas barras auriculares. A assepsia do campo cirúrgico foi realizada com uma solução de álcool iodado 2%. Em seguida, foi administrada uma solução de anestésico local (lidocaína 3%/noradrenalina 1:50.000; Dentsply, Brasil) por via subcutânea (s.c.) no local da incisão. Um corte longitudinal da pele, acima do crânio, permitiu a exposição e raspagem do perióstio para a exposição do crânio e das suturas lambdóide e coronal. Após perfuração com broca odontológica, dois parafusos de aço inoxidável foram afixados ao crânio do animal para oferecer suporte à posterior prótese de acrílico utilizada. Duas cânulas-guia de aço inoxidável (comprimento = 11,0 mm; diâmetro externo = 0,6 mm), confeccionada a partir de agulhas hipodérmicas (22G; 25,0 x 7,0 mm), foram implantadas bilateralmente tendo em vista o HD seguindo as coordenadas: AP = -3,5 mm a partir da bregma, ML = \pm 2,6 mm em relação à sutura central, DV = 2,0 mm a partir do osso do crânio. As coordenadas foram obtidas usando o Atlas do Cérebro de Ratos (PAXINOS, WATSON, 2009). Posteriormente, uma camada de acrílico odontológico auto-polimerizável de secagem rápida foi aplicada para cobrir toda a superfície exposta do crânio e afixar as cânulas e os parafusos em uma prótese sólida. O procedimento de analgesia pós-cirúrgica foi realizado mediante uma injeção s.c. de flunixin meglumina (2,5 mg/kg; Schering-Plough, Brasil). Após a cirurgia, os animais foram mantidos em ambiente aquecido para evitar uma possível hipotermia causada pela anestesia. Em seguida, os animais foram levados ao biotério do Laboratório de Neurofarmacologia aonde permaneceram até a realização dos experimentos.

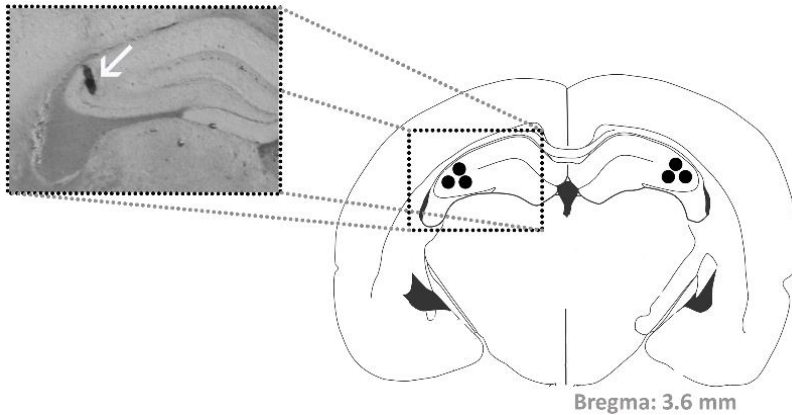
Os procedimentos experimentais foram iniciados 8 a 10 dias após a cirurgia estereotáxica. As microinfusões foram feitas utilizando uma microseringa (Hamilton, EUA) de 10 μ L conectada por um tubo de polietileno (PE10) a uma agulha gengival adaptada (30 G; comprimento = 12,3 mm. A agulha foi então

introduzida na cânula guia e a microinfusão das drogas foi realizada com o auxílio de uma bomba de microinfusão (Insight, Brasil) a uma taxa de $0,5 \mu\text{L}/\text{min}$ e um volume total de injeção de $0,5 \mu\text{L}/\text{hemisfério}$. O deslocamento de uma bolha de ar dentro do tubo de polietileno foi utilizado para verificar o deslocamento da droga. Após o término da microinfusão, a agulha foi mantida no local por mais 30 s para assegurar a microinfusão total da droga e reduzir o fluxo retrógrado da solução.

No final dos experimentos, os ratos foram profundamente anestesiados como já descrito anteriormente. Em seguida, os animais receberam a microinfusão de corante azul de Evans 0,1% ($0,2 \mu\text{L}/\text{hemisfério}$) para marcar os locais onde as drogas foram infundidas anteriormente. Os cérebros foram removidos do crânio, fixados em formalina 10% (48 h) e, posteriormente, submersos em solução de sacarose 30% por, pelo menos, 72 h antes da realização dos cortes histológicos para garantir a crioproteção dos mesmos. Para a verificação do sítio de microinfusão da droga, cortes coronais de $50 \mu\text{m}$ de espessura foram obtidos utilizando um criostato (Leica, Alemanha) a uma temperatura aproximada de $-21 \text{ }^\circ\text{C}$.

As imagens histológicas representativas foram obtidas com o auxílio de um microscópio estereoscópico SZX16 (Olympus, Japão) e comparadas com os diagramas do cérebro de ratos (PAXINOS, WATSON, 2009). Em todos os experimentos, somente os animais com histologia bilateral para o HD (**Figura 6**) foram incluídos na análise estatística (aproximadamente 89% do total de todos os grupos experimentais).

Figura 6. Imagem representativa do local de microinfusão das drogas no HD e diagrama esquemático mostrando os três principais locais de microinfusão (círculos preenchidos; 3,60 mm posterior ao *Bregma*).



4.4. PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS

4.4.1 Protocolo geral de condicionamento aversivo contextual (CAC)

O CAC foi realizado em uma caixa retangular (35 x 20 x 30 cm) com as paredes laterais e a posterior de alumínio e com uma parede frontal e uma porta de teto em acrílico. O piso gradeado, feito com barras de aço inoxidável (3 mm de diâmetro, com 9 mm de espaçamento) é conectado a um gerador de choques elétricos (Insight, Brasil), permitindo a administração de choques elétricos controlados. No presente estudo essa caixa de condicionamento foi designada como contexto A e foi utilizada para a avaliação da expressão das respostas defensivas pareadas ao choque. Uma segunda caixa, cúbica (30 x 30 x 30 cm), feita inteiramente de vidro transparente e com uma tampa gradeada, foi utilizada como um contexto novo e não-pareado ao choque, sendo designada aqui como contexto B. Por apresentar características contextuais diferentes daquelas apresentadas pelo contexto A, o contexto B foi utilizado para avaliação e determinação de respostas defensivas generalizadas. Os testes realizados no contexto A e B foram feitos em salas experimentais diferentes, sendo ambos

contextos limpos ao término de cada teste com uma solução de etanol 10% e secos com papel toalha.

O protocolo experimental foi iniciado com uma sessão de familiarização (FAM), na qual se permitiu aos animais explorar livremente o contexto A por 3 min para o reconhecimento do aparato. Após o término da FAM, os animais foram devolvidos às suas caixas moradias. Esta exposição prévia ao contexto a ser condicionado teve como objetivo facilitar a aquisição da memória contextual (FANSELOW *et al.*, 1990). Vinte e quatro horas depois, os animais foram novamente colocados no contexto A (EC; estímulo condicionado) para a sessão de condicionamento. Após 30 s iniciais de exposição ao contexto A (período pré-choque), cada grupo experimental foi submetido a um dos três diferentes protocolos de CAC utilizando diferentes intensidades de choque elétrico nas patas (EI; estímulo incondicionado): CAC fraco = 1 choque nas patas de 0,4 mA; CAC moderado = 1 choque nas patas de 0,7 mA; ou CAC forte = 3 choques nas patas de 1,0 mA (60 Hz, por 3 s, com um intervalo de 30 s entre cada choque). Após o condicionamento, os animais permaneceram no contexto A por mais 30 s (período pós-choque) antes de retornarem ao biotério setorial.

Para avaliar os efeitos do tratamento farmacológico sobre a consolidação da memória aversiva contextual, os animais foram reexpostos ao contexto A 1 e 8 d após um dos protocolos de CAC descritos anteriormente na ausência do EI (Testes A1 e A2, respectivamente). Vinte e quatro horas após os Testes A1 e A2 (dia 2 e dia 9, respectivamente), os animais foram expostos a um contexto novo e não pareado (contexto B, Testes B1 e B2, respectivamente). Em um experimento pontual (experimento 5), decidimos avaliar a persistência das alterações encontradas na sessão de teste em um período de tempo mais remoto. Nesse caso, o Teste A e o Teste B foram realizados no dia 28 e 29, respectivamente, após a sessão de condicionamento. Todas as sessões de teste duraram 3 min. É importante ressaltar que os Testes A2 e B2 foram realizados apenas quando a análise estatística revelou efeitos significativos do tratamento durante os Testes A1 e/ou B1. As drogas e respectivos veículos foram microinfundidos imediatamente ou 6 h após a sessão de condicionamento (**Figura 7A**).

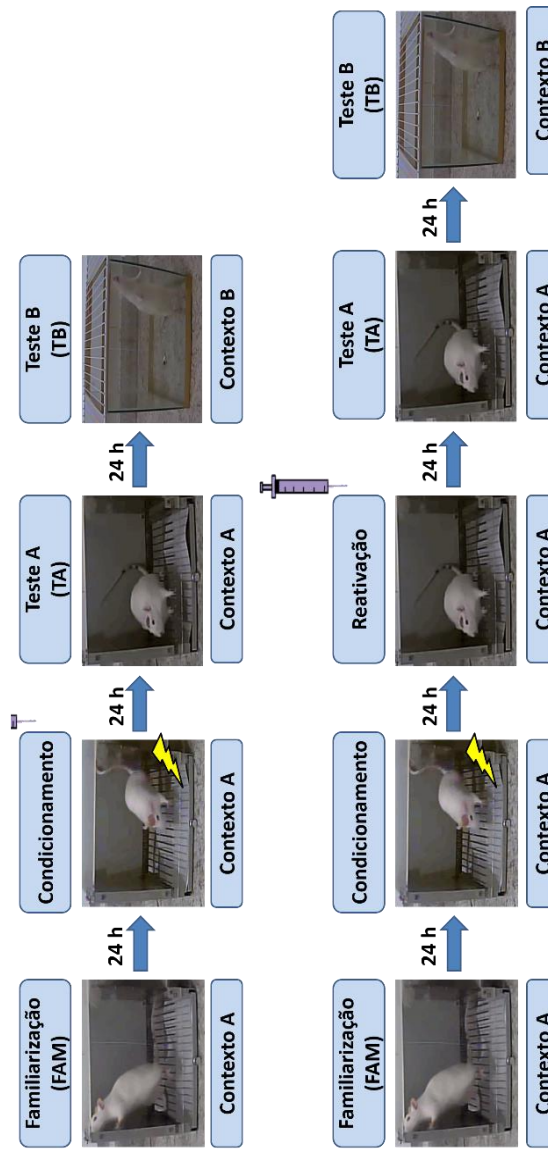
Para avaliar os efeitos do tratamento farmacológico sobre a reconsolidação da memória aversiva contextual, os animais

foram reexpostos ao contexto A na ausência do EI 24 h após a sessão de condicionamento moderado ou forte para uma sessão de reativação da memória. Os animais foram então reexpostos ao contexto A 1 e 8 d após a sessão de reativação na ausência do EI (Testes A1 e A2, respectivamente). Vinte e quatro horas após os Testes A1 e A2 (dia 2 e dia 9, respectivamente), os animais foram expostos a um contexto novo e não pareado (contexto B, Testes B1 e B2, respectivamente). Todas as sessões de teste duraram 3 min. É importante ressaltar que os Testes A2 e B2 foram realizados apenas quando a análise estatística revelou efeitos significativos do tratamento durante os Testes A1 e/ou B1. As drogas e respectivos veículos foram microinfundidos imediatamente ou 6 h após a sessão de reativação da memória (**Figura 7B**).

Nesse trabalho foi considerado o tempo de congelamento como um índice de retenção da memória. Esse comportamento foi definido como a ausência total de movimentos do corpo e da cabeça, exceto aqueles associados à respiração e à vocalização (BLANCHARD, BLANCHARD, 1969). Animais que expressaram outras respostas defensivas durante a sessão de teste/reativação (por exemplo, o comportamento de fuga) foram excluídos dos experimentos (aproximadamente 4% do total de animais utilizados nesse trabalho).

Todas as sessões experimentais foram gravadas por um sistema de câmera de vídeo. O tempo de congelamento em cada sessão foi quantificado (em segundos) com auxílio de um cronômetro. Os dados foram expressos como a porcentagem do tempo de congelamento em relação ao tempo total da sessão (3 min).

Figura 7. Protocolo geral de condicionamento aversivo contextual utilizado em laboratório.



B

Protocolo geral utilizado nesse trabalho para investigar o efeito das manipulações farmacológicas sobre as etapas de **(A)** consolidação e **(B)** reconsolidação da memória aversiva contextual. As “seringas” indicam o momento do tratamento farmacológico. Os “raios” representam o choque elétrico nas patas utilizado como EI para promover o condicionamento aversivo contextual. Os Testes A2 e B2 não estão representados na figura. Notar as diferenças entre os contextos A e B.

4.4.2 Protocolo de reinstalação da memória aversiva contextual

Basicamente, esse protocolo foi composto, em sequência, por uma sessão de FAM (contexto A), de condicionamento (contexto A), de reativação (contexto A; Teste A1), de extinção (contexto A; curva de extinção), além do teste de retenção da extinção (contexto A; Teste A2), uma sessão de reinstalação (contexto C) e um teste de reinstalação (Teste A3), tal como descrito detalhadamente a seguir.

O protocolo foi iniciado com uma sessão de FAM, na qual se permitiu aos animais explorar livremente o contexto A por 3 min para o reconhecimento do aparato. Após o término da FAM, os animais foram devolvidos às suas caixas moradias. Vinte e quatro horas depois, os animais foram novamente colocados no contexto A para uma sessão de CAC forte (tal como já descrito anteriormente; 3 choques de 1,0 mA). Após o término dessa sessão, os animais retornaram ao biotério setorial em suas caixas-moradia. No dia seguinte, os animais foram reexpostos ao contexto A por 3 min, na ausência do EI, para a sessão de reativação da memória, recebendo, imediatamente após, a microinfusão de veículo ou GR 89696 0,1 nmol no HD. O teste no contexto pareado foi realizado no dia seguinte (Teste A1). Sete dias após, esses mesmos animais foram submetidos a uma sessão de extinção, a qual consistiu da exposição dos animais ao contexto A durante 15 min. Nesse período, o tempo de congelamento dos animais foi avaliado em blocos de 3 min cada (total de 5 blocos). Essa sessão teve como objetivo equiparar o tempo de congelamento do grupo veículo com o do grupo GR 89696 0,1 nmol. O teste de retenção da extinção foi realizado no dia seguinte (Teste A2). Vinte e quatro horas após, foi realizada a sessão de reinstalação da memória, utilizando uma caixa quadrada diferente (25 x 25 x 32 cm) com paredes e uma porta de teto em acrílico cinza. O piso gradeado, feito com barras de aço inoxidável (5 mm de diâmetro, com 10 mm de espaçamento) encontrava-se conectado a um gerador de choques elétricos (Insight, Brasil), permitindo a administração de choques elétricos controlados, sendo essa caixa designada como contexto C. Com o intuito de tornar esse contexto tão diferente quanto possível daquele contexto usado na sessão de condicionamento (isto é, do contexto A), foram adicionadas faixas pretas com 1,5 cm de

largura dispostas verticalmente, com espaçamento de 1 cm entre cada faixa, na parede posterior do contexto C. Este contexto foi utilizado para a aplicação de um único estímulo elétrico nas patas dos animais (também chamado de choque lembrete; 1 choque de 0,5 mA). Por fim, o teste da reinstalação foi realizado no dia seguinte (Teste A3).

4.4.3 Teste de borrifagem com sacarose

Esse teste foi utilizado para avaliar uma forma de comportamento motivacional considerado semelhante com alguns sintomas de anedonia e comportamento apático (WILLNER, 2005). O procedimento consistiu em borrifar, por duas vezes, uma solução de sacarose 10% sobre o dorso de cada rato que já havia tido a experiência prévia do CAC. Em seguida, os animais foram individualmente colocados em um cilindro feito de acrílico para a avaliação comportamental. Devido a sua viscosidade, a solução de sacarose se adere à pelagem dos ratos e estes iniciam o comportamento de autolimpeza (do inglês, *grooming*). Depois de aplicada a solução de sacarose, os animais foram observados por um período de 15 min, período em que se registrou o tempo para a primeira a autolimpeza, bem como o tempo total de autolimpeza direcionada ao dorso, como medidas de autocuidado e comportamento motivacional. Após o fim de cada teste, o cilindro de acrílico foi limpo com uma solução de etanol 10% e seco com papel toalha.

4.5 ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING

Após os experimentos comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação e tiveram seus cérebros removidos e lavados com solução de NaCl 0,9% à 4^o C. Em seguida, os hipocampus dorsais desses animais foram dissecados (com auxílio do atlas de Paxinos e Watson, 2009) e armazenados em *freezer* a -80^o C até o momento do uso. Cabe ressaltar que os cérebros foram manipulados somente sobre uma placa de Petri mantida em gelo seco.

As amostras de HD foram homogeneizadas manualmente (com auxílio de micro pistilos) em tampão RIPA composto por Nonidet P-40 1% (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA), deoxicolato de sódio 0,5%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% e

PBS (pH 7,4) na presença dos seguintes inibidores enzimáticos: leupeptina 20 µg/mL, aprotinina 10 µg/mL, pepstatina A 20 µg/mL e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1 mM.

Após a homogeneização, as amostras foram incubadas em gelo por 30 min e, em seguida, centrifugadas (10.000 r.p.m., 4° C, durante 10 min). O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado sob as mesmas condições. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi coletado, sendo este o extrato celular total contendo as proteínas dissolvidas no meio. Em seguida, foi realizada a determinação de proteínas das amostras preparadas utilizando o equipamento *NanoDrop Spectrophotometer* ND-1000 e a função *Protein A280* do programa *NanoDrop 1000 v3.7* (Thermo Scientific; Rockford, IL, EUA). Os extratos dos tecidos previamente preparados foram então diluídos de modo a apresentar a mesma concentração final de proteína (5,5 mg/ml), misturados em volumes iguais ao tampão de amostra 5 vezes concentrada (Tris-HCl 150 mM (pH 6,8), β-mercaptoetanol 15%, SDS 6%, azul de bromofenol 0,3% e glicerol 25%) e fervidas por 5 min à 100° C. As amostras foram armazenadas em *freezer* com temperatura controlada a -20° C até o momento do uso.

Para a realização dos experimentos de *Western blotting*, quantidades iguais de proteínas para cada amostra de tecido cerebral (30 ou 40 µg/poço), foram separadas por eletroforese em gel de poliácridamida e SDS (12%) (300 mA e 150V por 1,5 h). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose usando um sistema de células Mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA) seguindo o protocolo do fabricante (300 mA e 100 V por 2 h). Após a transferência, as membranas foram incubadas com uma solução de bloqueio (BSA a 10% em TBS-T) por no mínimo 1 h (2 – 8° C) a fim de se garantir o bloqueio de possíveis reações inespecíficas. Após a lavagem em TBS-T (5 vezes), as membranas foram incubadas com o anticorpo primário contra a proteína de interesse (anticorpo monoclonal de coelho anti-receptor kappa opioide [EPR18881] (ab183825, 1:1000; Abcam, MA, USA) durante 14 - 16 h (2 – 8° C). Após a retirada do anticorpo primário, as membranas foram incubadas, por pelo menos 2 h, com o anticorpo secundário (anticorpo policlonal de cabra anti-coelho IgG conjugado à peroxidase; 1:20.000; Cell Signaling Technology, MA, EUA). Os imunocomplexos foram visualizados

usando o sistema de detecção de substrato quimioluminescente, *SuperSignal West Femto* (Thermo Scientific; Rockford, IL, EUA) exposto ao sistema de fotodocumentação ChemiDocTMXRS (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, CA, EUA). As análises foram realizadas utilizando o programa NIH ImageJ v1.48 (NIH; Bethesda, MD, EUA) através da quantificação da densidade óptica. Os dados foram normalizados contra o controle β -actina (razão κ ORs/ β -actina) e expressos como % do grupo controle.

4.6 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO LIGADO À ENZIMA (ELISA)

Após os experimentos comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação e tiveram seus cérebros removidos e lavados com solução de NaCl 0,9% à 4^o C. Em seguida, os hipocampus dorsais desses animais foram dissecados (com auxílio do atlas de Paxinos e Watson, 2009) e armazenados em freezer a -80^o C até o momento do uso. Ressaltamos que os cérebros foram manipulados somente sobre uma placa de Petri mantida em gelo seco.

As amostras de HD foram colocadas em tampão fosfato (PBS) contendo Tween® 20 (0,05%), PMSF (0,1 mM), ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) (10 mM), aprotinina (2 ng/ml) e cloreto de benzametônio (0,1 mM) e, em seguida, foram homogeneizadas manualmente (com auxílio de micro pistilos). As amostras homogeneizadas foram então centrifugadas a 6900 \times g por 10 min (4^oC) e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80^oC, até o momento da análise. O conteúdo proteico total do sobrenadante foi mensurado pelo método de Bradford, utilizando uma curva padrão de calibração com BSA.

Alíquotas de 100 μ L foram utilizadas para mensurar as concentrações do BDNF, utilizando kits de ELISA (R&D Systems, USA; No. DY248) (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2018), de acordo com as instruções do fabricante. As sensibilidades dos ensaios ficaram no intervalo de 23,4 -1500 pg/mL. A concentração do BDNF foi obtida por interpolação de uma curva padrão utilizando um ensaio colorimétrico, por mensuração colorimétrica a 450 nm (corrigidas pela subtração da leitura a 550 nm) em um leitor de placas de ELISA (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co., Nanjing, China). Todos os resultados foram expressos em pg de BDNF/mg de proteína.

4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.7.1 Experimento 1: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC moderado

A fim de investigar se o bloqueio dos κ ORs presentes no HD de ratos poderia potencializar a consolidação de uma memória aversiva contextual, 38 ratos foram alocados aleatoriamente em quatro grupos ($n = 8-10/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou *nor*-BNI 1,0, 3,0 ou 10,0 nmol) realizado imediatamente após o pareamento do contexto A com 1 choque de 0,7 mA. O Teste A1 (TA1), o Teste B1 (TB1), o Teste A2 (TA2) e o Teste B2 (TB2) foram realizados nos dias 1, 2, 8 e 9 após a sessão de condicionamento, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 8A**.

4.7.2 Experimento 2: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs 6 h após um CAC moderado

A fim de avaliar se o envolvimento dos HD κ ORs seria limitado à consolidação da memória, 17 ratos foram alocados aleatoriamente em dois grupos ($n = 8-9/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou *nor*-BNI 3,0 nmol) realizado 6 h após o pareamento do contexto A com 1 choque de 0,7 mA. O Teste A (TA) e o Teste B (TB) foram realizados nos dias 1 e 2 após a sessão de condicionamento, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 9A**.

4.7.3 Experimento 3: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após a exposição no contexto A sem a experiência do choque

Em seguida, foi avaliado se a microinfusão de *nor*-BNI *per se* poderia induzir a formação de memórias aversivas, tal como relatado para a microinfusão de algumas drogas em determinadas estruturas cerebrais (GUITTON, DUDAI, 2004; CAVALLI *et al.*, 2009). Para isso, 12 animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos ($n = 5-7/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou *nor*-BNI 3,0 nmol) realizado imediatamente após a exposição dos animais ao contexto A sem a experiência do choque nas patas (sem-EI). Ambos os grupos

foram reexpostos ao contexto A (TA) e expostos ao contexto B (TB) nos dias 1 e 2 após a experiência no contexto A, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 10A**.

4.7.4 Experimento 4: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após uma experiência de choque não pareada ao contexto

Tem sido demonstrado no protocolo do CAC que quando os animais recebem um choque imediatamente após entrarem no contexto, isto é, sem um período pré-choque inicial, eles não expressam respostas de congelamento em um teste subsequente de retenção da memória no mesmo contexto (LANDEIRA-FERNANDEZ *et al.*, 2006). Esta evidência sugere a ausência de aprendizado aversivo contextual na ausência do período pré-choque. Este fenômeno tem sido referido na literatura como “déficit por choque imediato” (do inglês, *immediate shock deficit*).

Assim, a fim de investigar se o maior tempo de congelamento nos animais tratados com *nor*-BNI poderia ser induzido por uma resposta de sensibilização à droga devido à experiência do choque elétrico nas patas, 16 ratos foram alocados aleatoriamente em dois grupos ($n = 8/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou *nor*-BNI 3,0 nmol) realizado imediatamente após uma experiência de choque não pareada ao contexto (protocolo referido como déficit por choque imediato). Para evitar qualquer possibilidade de condicionamento contextual, esse protocolo foi realizado com animais sem familiarização prévia ao contexto A (sem-FAM) e que receberam o choque nas patas (1 choque de 0,7 mA) o mais breve possível após a sua entrada no contexto A (em até, no máximo, 5 s). Após o término do choque, os ratos foram rapidamente removidos do contexto A. Ambos os grupos foram reexpostos ao contexto A (TA) e expostos ao contexto B (TB) nos dias 1 e 2 após a experiência do choque imediato, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 11A**.

4.7.5 Experimento 5: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC moderado sobre a consolidação da memória em um período de tempo mais remoto

Algumas evidências na literatura têm sugerido que a *nor*-BNI pode atuar de maneira duradoura no sistema nervoso central (por aproximadamente 3 semanas), mesmo após uma única administração central dessa droga (HORAN *et al.*, 1992; JONES, HOLTZMAN, 1992; BRUCHAS *et al.*, 2007). Sendo assim, para avaliar se o aumento no tempo de congelamento induzido pela *nor*-BNI duraria até um período de tempo mais remoto, 19 ratos foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos ($n = 9-10/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou *nor*-BNI 3,0 nmol) realizado imediatamente após o pareamento no contexto A com 1 choque de 0,7 mA. Ambos os grupos foram reexpostos ao contexto A (TA) e expostos ao contexto B (TB) nos dias 28 e 29 após a sessão de condicionamento, respectivamente. Uma vez que as sessões de Teste A2 vinham sendo realizadas no dia 7 após o Teste A1, decidimos realizar o Teste A, aqui, em um período de tempo quatro vezes maior - 28 dias após a sessão de condicionamento. Nesse cenário, os animais possivelmente já teriam eliminado completamente a droga.

4.7.6 Experimento 6: Efeito do CAC moderado sobre a imunomarcção de HD κ ORs durante o período de consolidação da memória

Com o objetivo de avaliar se o protocolo de CAC moderado poderia influenciar os níveis de κ ORs na região do HD durante o período de consolidação da memória, foi realizada uma curva temporal de imunomarcção para esses receptores. Trinta e cinco animais foram utilizados no total nesse experimento. Basicamente, os animais tiveram seus cérebros removidos e, subsequentemente, seus hipocampos dorsais dissecados com base no tempo decorrido a partir do final da sessão de condicionamento (0, 1, 3 e 6 h). Para isso, 28 animais operados foram condicionados usando um protocolo de CAC moderado e depois foram alocados aleatoriamente em um dos quatro grupos experimentais citados acima ($n = 7/\text{grupo}$). Em adição, um grupo *naïve* (controle), constituído de animais não operados que foram

mantidos no biotério até o procedimento de dissecação, foi incluído na análise ($n = 7/\text{grupo}$). Os pontos de tempo para a eutanásia foram definidos com base nos achados de que drogas administradas imediatamente após o CAC, mas não 6 h após, foram capazes de afetar a consolidação da memória aversiva contextual (GAZARINI *et al.*, 2013; STERN *et al.*, 2017). O desenho experimental está esquematizado na **Figura 12A**.

4.7.7 Experimento 7: Avaliação da especificidade da imunomarcção dos HD κ ORs na formação da memória associativa

Para avaliar se o recrutamento dos κ ORs no HD ocorre especificamente durante a formação de uma memória associativa, foi realizado um experimento para comparar a imunomarcção dos HD κ ORs de animais que receberam o pareamento choque-contexto (memória associativa) com aqueles animais que receberam apenas a experiência do choque ou do contexto (experiências não associativas). O experimento foi constituído de 24 ratos no total. Os grupos experimentais ($n = 6/\text{grupo}$) foram constituídos de: animais *naïve* (grupo *naïve*), animais que foram expostos somente ao contexto A (grupo contexto A-sem choque), animais que tiveram a experiência associativa completa (grupo choque-contexto A; 1 choque de 0,7 mA) e animais que foram expostos somente a experiência de choque não associativa (grupo déficit por choque imediato; 1 choque de 0,7 mA; protocolo descrito na sessão 4.7.4). Os cérebros e, posteriormente, os hipocampos dorsais foram coletados 1 h após a conclusão da sessão experimental. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 13A**.

4.7.8 Experimento 8: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC moderado sobre os níveis de BDNF hipocampais durante a consolidação da memória

Tem sido demonstrado que a consolidação da memória contextual requer alterações na plasticidade neuronal no HD, a qual depende, dentre outros mediadores, da expressão de BDNF (LEE *et al.*, 2004, ALONSO *et al.*, 2005, LUBIN *et al.*, 2008). Assim, para investigar se a microinfusão de *nor*-BNI poderia

aumentar os níveis de BDNF hipocampais durante um período que corresponde a consolidação da memória aversiva contextual, 15 ratos foram alocados aleatoriamente em três grupos ($n = 5/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou *nor*-BNI 1,0 nmol e 3,0 nmol) realizado imediatamente após o pareamento no contexto A com 1 choque de 0,7 mA. Noventa minutos após, esses animais foram eutanasiados, juntamente com um grupo adicional de animais *naïve* ($n = 5$), e tiveram seus hipocampus dorsais coletados para posterior quantificação dos níveis de BDNF pela técnica de ELISA. O tempo de eutanásia foi escolhido com base nos achados de ROSAS-VIDAL e colaboradores (2014) em que maiores níveis de BDNF foram encontrados na região do hipocampo 1-2 h após a sessão de extinção. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 14A**.

4.7.9 Experimento 9: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC forte

A fim de avaliar se o bloqueio dos HD κ ORs poderia interferir na consolidação de uma memória aversiva contextual mais intensa, 34 ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos ($n = 8-9/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou *nor*-BNI 1,0, 3,0 ou 10,0 nmol) realizado imediatamente após o pareamento do contexto A com 3 choques de 1,0 mA. O Teste A1 (TA1), o Teste B1 (TB1), o Teste A2 (TA2) e o Teste B2 (TB2) foram realizados nos dias 1, 2, 8 e 9 após a sessão de condicionamento, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 15A**.

4.7.10 Experimento 10: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs 6 h após um CAC forte

A fim de avaliar se o envolvimento dos HD κ ORs seria limitado a consolidação da memória de um CAC forte, 22 ratos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos ($n = 7-8/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou *nor*-BNI 3,0 e 10,0 nmol) realizado 6 h após um CAC forte (3 choques de 1,0 mA). O Teste A (TA) e o Teste B (TB) foram realizados nos dias 1 e 2 após a sessão de condicionamento, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 16A**.

4.7.11 Experimento 11: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC fraco

Tem sido demonstrado que os HD κ ORs são recrutados somente em situações de estresse mais intensas (LUNDBERG *et al.*, 1981; WAGNER *et al.*, 1991; SHIRAYAMA *et al.*, 2004), sugerindo que a contribuição desses receptores seria menor conforme a intensidade da experiência aversiva diminui. Para testar essa possibilidade, 18 ratos foram aleatoriamente distribuídos em três grupos ($n = 6$ /grupo) com base no tratamento (veículo ou *nor*-BNI 3,0 ou 10,0 nmol) realizado imediatamente após o pareamento do contexto A com um único choque fraco (0,4 mA). Adicionalmente, no anseio de descartar a possibilidade de que a intensidade do protocolo de condicionamento usado aqui não seria suficiente para promover a formação de uma memória associativa, foi incluído neste experimento um grupo de animais ($n = 6$) tratados com ioimbina, um antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, na dose de 2,0 mg/kg i.p.. A ioimbina já demonstrou ser capaz de potencializar a consolidação de uma memória fraca em condições similares (GAZARINI *et al.*, 2013). Assim, se pelo menos um traço de memória fosse formado, seria esperado um maior tempo de congelamento nos animais tratados com ioimbina em relação ao grupo veículo. O Teste A (TA) e o Teste B (TB) foram realizados nos dias 1 e 2 após a sessão de condicionamento, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 17A**.

4.7.12 Experimento 12: Efeito do agonista seletivo dos κ_2 ORs imediatamente após um CAC forte

Uma vez que os κ_2 ORs são altamente expressos no hipocampo de ratos, enquanto que os κ_1 ORs são praticamente ausentes (UNTERWALD *et al.*, 1991), poderia ser hipotetizado que os primeiros teriam uma contribuição proeminente na modulação da consolidação da memória. Para investigar essa possibilidade, 33 ratos foram alocados aleatoriamente em quatro grupos ($n = 8-9$ /grupo) com base no tratamento (veículo ou o agonista seletivo dos κ_2 ORs, GR 89696, 0,1, 0,3 e 1,0 nmol) realizado imediatamente após o pareamento do contexto A com

3 choques de 1,0 mA. O Teste A1 (TA1), o Teste B1 (TB1), o Teste A2 (TA2) e o Teste B2 (TB2) foram realizados nos dias 1, 2, 8 e 9 após a sessão de condicionamento, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 18A**.

4.7.13 Experimento 13: Efeito do agonista seletivo dos κ_2 ORs 6 h após um CAC forte

A fim de demonstrar que o efeito do GR 89696 seria limitado a consolidação da memória, 28 ratos foram alocados aleatoriamente em três diferentes grupos ($n = 9-10/\text{grupo}$) baseado no tratamento (veículo ou GR 89696 0,3 e 1,0 nmol) realizado 6 h após o pareamento do contexto A com 3 choques de 1,0 mA. O Teste A (TA) e o Teste B (TB) foram realizados nos dias 1 e 2 após a sessão de condicionamento, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 19A**.

4.7.14 Experimento 14: Efeito do agonista seletivo dos κ_1 ORs imediatamente após um CAC forte

Para avaliar a contribuição dos HD κ_1 ORs na consolidação da memória, 43 ratos foram alocados aleatoriamente em cinco grupos ($n = 8-10/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou o agonista seletivo dos κ_1 ORs, U-69593, 0,1, 0,3 ou 1,0 nmol - doses equimolares de GR 89696 - e 30,0 nmol - dose equipotente de GR 89696 0,3 nmol; BUTELMAN *et al.*, 2001) realizado imediatamente após o pareamento do contexto A com 3 choques de 1,0 mA. O Teste A (TA) e o Teste B (TB) foram realizados nos dias 1 e 2 após a sessão de condicionamento, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 20A**.

4.7.15 Experimento 15: Efeito do agonista dos κ_2 ORs imediatamente após um CAC forte sobre os níveis de BDNF hipocampais durante a consolidação da memória

A fim de investigar se a microinfusão de GR 89696 poderia diminuir os níveis de BDNF na região do HD durante a consolidação da memória aversiva contextual, 15 ratos foram

alocados aleatoriamente em três grupos ($n = 5/\text{grupo}$) baseado no tratamento (veículo ou GR 89696 0,1 nmol e 0,3 nmol) realizado imediatamente após o pareamento no contexto A com 3 choques de 1,0 mA. Adicionalmente, um grupo de animais ($n = 5$) tratados com o U-69593, na dose 30,0 nmol (dose equipotente - GR 89696 0,3 nmol; BUTELMAN *et al.*, 2001) foi incluído. Noventa minutos após a microinfusão das drogas, esses animais foram eutanasiados, juntamente com um grupo adicional de animais *naïve* ($n = 5$), e tiveram seus hipocampus dorsais coletados para posterior quantificação dos níveis de BDNF pela técnica de ELISA. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 21A**.

4.7.16 Experimento 16: Efeito do pré-tratamento com *nor*-BNI sobre o prejuízo de consolidação da memória induzido pelo GR 89696

Posteriormente, foi investigado se o prejuízo de consolidação da memória induzido pelo GR 89696 foi de fato mediado pela ativação dos κ ORs. Para isso, 32 ratos foram condicionados no contexto A com 3 choques de 1,0 mA. Após, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos iniciais ($n = 16/\text{grupo}$) baseado no pré-tratamento (veículo ou *nor*-BNI 1,0 nmol; dose subefetiva escolhida com base nos achados comportamentais do experimento 1) realizado imediatamente após a sessão de condicionamento. Posteriormente, cada grupo foi novamente dividido em dois outros grupos ($n = 7-9/\text{grupo}$) baseado no tratamento (veículo ou GR 89696 0,3 nmol – dose efetiva) realizado dez minutos após o pré-tratamento. O Teste A1 (TA1), o Teste B1 (TB1), o Teste A2 (TA2) e o Teste B2 (TB2) foram realizados nos dias 1, 2, 8 e 9 após a sessão de condicionamento, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 22A**.

4.7.17 Experimento 17: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC moderado

A fim de investigar se o bloqueio dos HD κ ORs poderia também potencializar a reconsolidação de uma memória aversiva

contextual, 30 ratos foram alocados aleatoriamente em quatro grupos ($n = 7-8/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou *nor*-BNI 1,0, 3,0 e 10,0 nmol) realizado imediatamente após a sessão de reativação da memória de um CAC moderado (1 choque de 0,7 mA). O Teste A (TA) e o Teste B (TB) foram realizados nos dias 1 e 2 após a sessão de reativação, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 23A**.

4.7.18 Experimento 18: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC forte

Uma vez que não observamos nenhum efeito da microinfusão de *nor*-BNI no protocolo de CAC moderado, decidimos investigar se os κ ORs estariam envolvidos na reconsolidação de uma memória aversiva contextual mais intensa. Para isso, 39 ratos foram alocados aleatoriamente em cinco grupos ($n = 7-9/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou *nor*-BNI 0,3, 1,0, 3,0 e 10,0 nmol) realizado imediatamente após a sessão de reativação da memória de um CAC forte (3 choques de 1,0 mA). O Teste A1 (TA1), o Teste B1 (TB1), o Teste A2 (TA2) e o Teste B2 (TB2) foram realizados nos dias 1, 2, 8 e 9 após a sessão de reativação, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 24A**.

4.7.19 Experimento 19: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs 6 h após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC forte

A fim de avaliar se o envolvimento dos HD κ ORs seria limitado à reconsolidação da memória de um CAC forte, 16 ratos foram alocados aleatoriamente em dois grupos ($n = 8/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou *nor*-BNI 1,0 nmol) realizado 6 h após a sessão de reativação da memória de um CAC forte (3 choques de 1,0 mA). Nesse período de tempo, uma memória condicionada aversiva já estaria reconsolidada e, portanto, não mais suscetível a interferentes (NADER *et al.*, 2000; STERN *et al.*, 2012). O Teste A (TA) e o Teste B (TB) foram realizados nos dias 1 e 2 após a sessão de reativação, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 24D**.

4.7.20 Experimento 20: Efeito do agonista dos κ_2 ORs imediatamente após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC forte

O próximo passo teve como objetivo avaliar o envolvimento dos HD κ_2 ORs na reconsolidação da memória aversiva contextual forte. Para isso, 33 ratos foram alocados aleatoriamente em quatro grupos ($n = 8-9$ /grupo) com base no tratamento (veículo ou GR 89696 0,1, 0,3 ou 1,0 nmol) realizado imediatamente após a sessão de reativação da memória de um CAC forte (3 choques de 1,0 mA). O Teste A1 (TA1), o Teste B1 (TB1), o Teste A2 (TA2) e o Teste B2 (TB2) foram realizados nos dias 1, 2, 8 e 9 após a sessão de reativação, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 25A**.

4.7.21 Experimento 21: Efeito do agonista dos κ_2 ORs 6 h após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC forte

A fim de investigar se os efeitos da ativação dos HD κ_2 ORs seriam limitados a reconsolidação da memória de um CAC forte, 17 ratos foram alocados aleatoriamente em dois grupos ($n = 8-9$ /grupo) com base no tratamento (veículo ou GR 89696 0,1 nmol) realizado 6 h após a sessão de reativação da memória de um CAC forte (3 choques de 1,0 mA). O Teste A (TA) e o Teste B (TB) foram realizados nos dias 1 e 2 após a sessão de reativação, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 25D**.

4.7.22 Experimento 22: Efeito do agonista dos κ_2 ORs imediatamente após a reativação no protocolo de reinstalação

Uma interpretação alternativa para os resultados obtidos anteriormente com o GR 89696 seria de que esta droga estaria facilitando a extinção da memória ao invés de prejudicar o processo de reconsolidação, uma vez que ambos os processos resultam na redução de congelamento nos testes subsequentes. Sendo assim, utilizamos o protocolo de reinstalação para controlar essa possibilidade, considerando que apenas o congelamento vinculado à extinção apresenta reinstalação (ver

sessão 4.4.2 do material e métodos para mais detalhes sobre o protocolo) (DUVARCI, NADER, 2004; QUIRK, MUELLER, 2008). Nesse sentido, 17 animais foram alocados aleatoriamente em dois grupos ($n = 8-9/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou GR 89696 0,1 nmol) realizado imediatamente após a sessão de reativação da memória de um CAC forte (3 choques de 1,0 mA). O Teste A1 (TA1) foi realizado no dia 1 após a sessão de reativação. A sessão de extinção foi realizada no dia 7 após o Teste A1. O Teste A2 (TA2) foi realizado no dia 1 após a sessão de extinção e o Teste A3 (TA3) foi realizado no dia 1 após a sessão de reinstalação, cuja qual os animais receberam um choque lembrete (1 choque de 0,5 mA) no contexto C. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 26A**.

4.7.23 Experimento 23: Efeito do pré-tratamento com *nor*-BNI sobre o prejuízo de reconsolidação da memória induzido pelo GR 89696

A fim de confirmar que o prejuízo de reconsolidação da memória induzido pelo GR 89696 seria de fato mediado pela ativação dos κ ORs, 34 ratos foram condicionados no contexto A com 3 choques de 1,0 mA e, no dia seguinte, eles foram reexpostos ao contexto A para uma sessão de reativação. Após, os animais foram alocados aleatoriamente em dois grupos iniciais ($n = 17/\text{grupo}$) baseados no pré-tratamento (veículo ou *nor*-BNI 0,3 nmol; dose subefetiva escolhida com base nos achados comportamentais do experimento 18) realizado imediatamente após a sessão de reativação. Posteriormente, cada grupo foi novamente dividido em dois outros grupos ($n = 8-9/\text{grupo}$) baseado no tratamento (veículo ou GR 89696 0,1 nmol – dose efetiva) realizado dez minutos após o pré-tratamento. O Teste A1 (TA1), o Teste B1 (TB1), o Teste A2 (TA2) e o Teste B2 (TB2) foram realizados nos dias 1, 2, 8 e 9 após a sessão de reativação. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 27A**.

4.7.24 Experimento 24: Efeito da microinfusão de *nor*-BNI imediatamente após a reativação no teste de borrifagem com sacarose

Tem sido sugerido que os efeitos recompensadores de drogas apresentadas durante ou logo após a sessão de reativação da memória podem alterar a valência emocional dessa memória (HAUBRICH *et al.*, 2014; FERRER MONTI *et al.*, 2016; PEDRAZA *et al.*, 2018). Assim, a fim de avaliar se a *nor*-BNI poderia produzir alguma alteração no estado interno (motivação) do animal, 16 animais foram aleatoriamente alocados em dois grupos ($n = 8/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou *nor*-BNI 1,0 nmol) realizado imediatamente após a reativação da memória de um CAC forte (3 choques de 1,0 mA). O Teste A foi realizado no dia 1 após a sessão de reativação. Ambos os grupos (veículo e *nor*-BNI 1,0 nmol), além de um grupo adicional de animais *naïve* ($n = 8$), foram submetidos ao teste de borrifagem com sacarose no dia 1 após o Teste A. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 28A**.

4.7.25 Experimento 25: Efeito da microinfusão de GR 89696 imediatamente após a reativação no teste de borrifagem com sacarose

A fim de avaliar os efeitos da microinfusão de GR 89696 no teste de borrifagem com sacarose, 17 animais foram aleatoriamente alocados em dois grupos ($n = 8-9/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou GR 89696 0,1 nmol) realizado imediatamente após a reativação da memória de um CAC forte (3 choques de 1,0 mA). Ambos os grupos, além de um grupo adicional de animais *naïve* ($n = 8$), foram submetidos ao teste de borrifagem com sacarose no dia 1 após a sessão de reativação. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 28D**.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após a certificação da normalidade dos dados e de sua homocedasticidade, a porcentagem do tempo de congelamento nos contextos A e B foi expressa como média \pm EPM, sendo avaliada por análises de variâncias (ANOVA) separadas: ANOVA de uma via (fator independente: tratamento farmacológico) foi

usada nos experimentos 10, 11, 13, 14 e 17; ANOVA de uma via de medidas repetidas (fatores independentes: tratamento farmacológico e reexposição ao contexto A ou B) foi utilizada para a análise dos experimentos 1, 9, 12, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 24 e ANOVA de duas vias de medidas repetidas (fatores independentes: pré-tratamento farmacológico, tratamento farmacológico e reexposição ao contexto A ou B) foi utilizada no experimento 16 e 23. O teste de Newman-Keuls foi usado como teste *post hoc* para múltiplas comparações. Nos casos em que houve apenas dois grupos, a porcentagem do tempo de congelamento nos contextos A e B foi avaliada por testes *t* de Student separados para duas amostras não pareadas (experimentos 2, 3, 4, 5, 11, 19, 21 e 25).

O tempo total de autolimpeza e o tempo para a primeira autolimpeza foram expressos como média \pm EPM, sendo avaliados pela ANOVA de uma via (experimentos 24 e 25).

Os dados de ELISA foram apresentados como média \pm EPM, sendo analisados pela ANOVA de uma via (experimentos 8 e 15). O teste de Newman-Keuls foi usado como teste *post hoc* para múltiplas comparações.

Os experimentos de *Western blotting* foram realizados na forma de quatro experimentos independentes ($n = 2/\text{grupo/experimento}$). Os dados foram apresentados como média \pm EPM de três diferentes quantificações por banda, sendo analisados pela ANOVA de uma via (experimentos 6 e 7). O teste de Newman-Keuls foi usado como teste *post hoc* para múltiplas comparações.

O nível de significância estatística foi estabelecido em $P < 0,05$. Todos os resultados foram analisados pelo programa Statistica® 7.0 (StatSoft, EUA) e para a confecção dos gráficos foi utilizado o GraphPad Prism® 5 (GraphPad Prism, EUA).

5 RESULTADOS

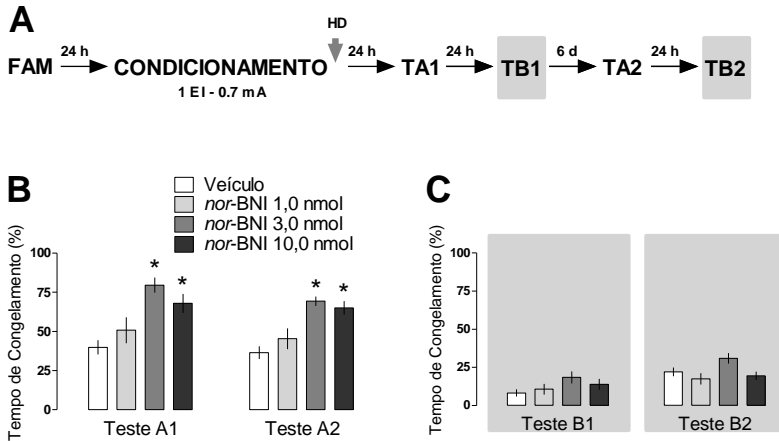
5.1 EXPERIMENTO 1: O ANTAGONISTA DOS KORS POTENCIALIZA A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA EM UM CAC MODERADO

A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeitos significativos do tratamento ($F_{(3,34)} = 12,29$, $P = 0,00001$) e das reexposições ao contexto A ($F_{(1,34)} = 4,80$, $P = 0,03$), mas nenhuma interação entre os fatores ($F_{(3,34)} = 0,47$, $P = 0,70$). Como mostrado na **Figura 8B**, os grupos tratados com *nor*-BNI nas doses de 3,0 ou 10,0 nmol apresentaram maior tempo de congelamento nos Testes A1 e A2 em comparação com os respectivos grupos veículos (Teste A1: $P = 0,003$ e $P = 0,04$; Teste A2: $P = 0,02$ e $P = 0,03$).

Nos Testes B1 e B2, a ANOVA de medidas repetidas não mostrou efeito significativo do tratamento sobre o tempo de congelamento dos animais ($F_{(3,34)} = 2,79$, $P = 0,05$). Embora tenha havido um efeito significativo das reexposições ao contexto B ($F_{(1,34)} = 36,98$, $P = 0,000001$), nenhuma interação significativa entre os fatores foi revelada ($F_{(3,34)} = 1,63$, $P = 0,19$). Como mostrado na **Figura 8C** (área cinza), a *nor*-BNI não induziu alterações no tempo de congelamento dos animais.

Nossos resultados indicam que o bloqueio dos HD κ ORs leva à potencialização da consolidação de uma memória aversiva contextual moderada, sugerindo que a ativação endógena desses receptores modula negativamente este processo.

Figura 8. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC moderado.



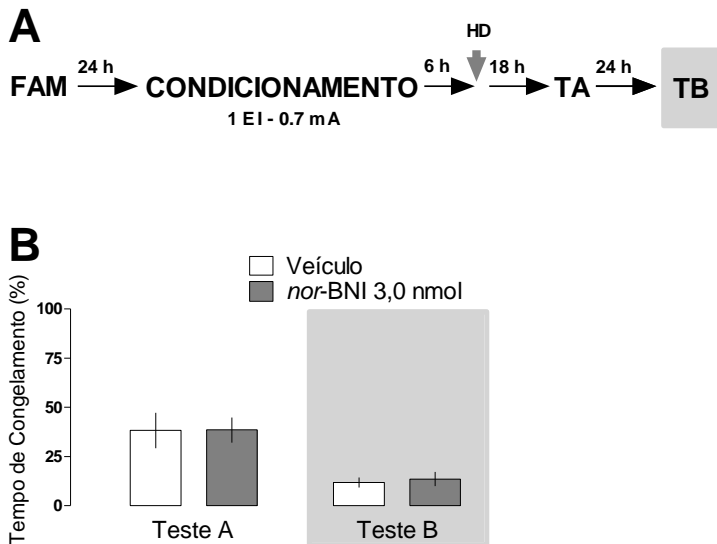
(A) Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. Os gráficos mostram a % do tempo de congelamento quando os animais foram testados **(B)** no contexto pareado (Testes A1 e A2; 1 e 8 dias após o CAC, respectivamente) e **(C)** no contexto não pareado (Testes B1 e B2; 2 e 9 dias após o CAC, respectivamente). Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 8-10/\text{grupo}$). * $P < 0,05$ quando comparado com o respectivo grupo veículo.

5.2 EXPERIMENTO 2: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS NÃO TEM EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO QUANDO REALIZADA 6 H APÓS O CAC MODERADO

O teste t de Student não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento sobre o tempo de congelamento durante o Teste A ($t_{15} = 0,0005$, $P = 0,98$) ou Teste B ($t_{15} = 0,13$, $P = 0,71$). Como mostrado na **Figura 9B**, em ambos os testes, não houve diferenças entre o grupo controle e o grupo tratado com *nor*-BNI.

Esses resultados sugerem que o recrutamento dos HDκORs é limitado à janela temporal de consolidação da memória aversiva contextual moderada.

Figura 9. Efeito da microinfusão do antagonista dos κORs 6 h após um CAC moderado.



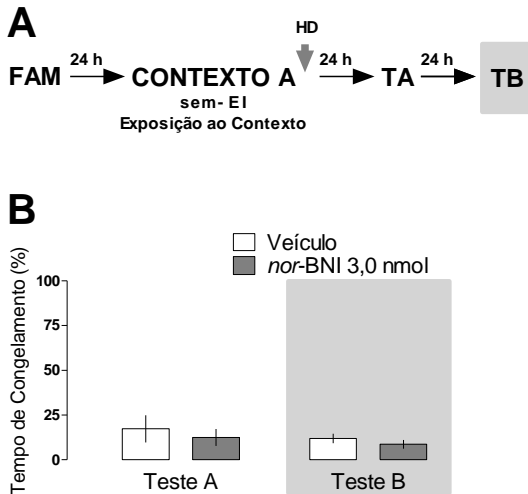
(A) Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. **(B)** O gráfico mostra a % do tempo de congelamento durante os testes A e B realizados 18 h e 48 h após o CAC moderado, respectivamente. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 8-9$ /grupo).

5.3 EXPERIMENTO 3: A *NOR*-BNI NÃO ATUA COMO UM ESTÍMULO INCONDICIONADO

O teste *t* de Student não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento sobre o tempo de congelamento durante o Teste A ($t_{(10)} = 0,33$, $P = 0,57$) ou Teste B ($t_{(10)} = 0,76$, $P = 0,40$). A **Figura 10B** ilustra como os dois grupos apresentaram um tempo de congelamento comparável.

Em resumo, a *nor*-BNI não foi capaz de atuar como um estímulo incondicionado, sugerindo que o bloqueio dos HD κ ORs *per se* não é suficiente para induzir um condicionamento contextual.

Figura 10. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após a exposição no contexto A sem a experiência do choque.



(A) Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. **(B)** O gráfico mostra a % de tempo de congelamento durante os Testes A e B realizados 24 h e 48 h após a experiência no contexto A, respectivamente. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 5-7$ /grupo).

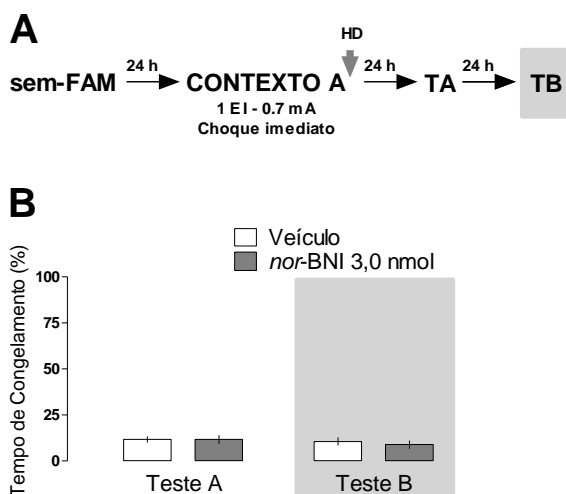
5.4 EXPERIMENTO 4: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS κ ORs NÃO TEM EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO NO PROTOCOLO DE DÉFICIT POR CHOQUE IMEDIATO

O teste *t* de Student não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento sobre o tempo de congelamento no Teste A ($t_{(14)} = 0,00001$, $P = 1,00$) ou Teste B ($t_{(14)} = 0,32$, $P =$

0,58). Como mostrado na **Figura 11B**, na ausência da experiência associativa, a *nor*-BNI não induziu alterações no tempo de congelamento durante ambos os testes.

Assim, nossos dados sugerem que o antagonismo dos HDκORs imediatamente após uma experiência não associativa de choque moderado não afeta o comportamento de congelamento.

Figura 11. Efeito da microinfusão do antagonista dos κORs imediatamente após uma experiência de choque não associada ao contexto.



(A) Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. **(B)** O gráfico mostra a % do tempo de congelamento durante os testes A e B realizados 24 h e 48 h após a experiência de choque imediato, respectivamente. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 8$ /grupo).

5.5 EXPERIMENTO 5: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS INDUZ UM AUMENTO DO TEMPO DE CONGELAMENTO QUE PERDURA POR PELO MENOS 28 DIAS

O teste *t* de Student mostrou um efeito significativo do tratamento sobre o tempo de congelamento durante o Teste A ($t_{(17)} = 22,22$, $P = 0,0002$). Conforme mostrado na **Tabela 1**, o grupo tratado com *nor*-BNI 3,0 nmol apresentou maior tempo de congelamento durante o Teste A, quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, não houve efeito significativo do tratamento sobre o Teste B ($t_{(17)} = 1,81$, $P = 0,19$).

Portanto, este resultado sugere que as ações da *nor*-BNI ocorreram dentro do período que corresponde à consolidação da memória, uma vez que é pouco provável que as ações dessa droga ainda estivessem presentes até o dia do teste.

Tabela 1: Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC moderado sobre a consolidação da memória em um período de tempo mais remoto.

	<i>Veículo</i> (<i>n</i> = 10)	<i>nor-BNI 3,0</i> <i>nmol</i> (<i>n</i> = 9)	<i>Análise Estatística</i>
Teste A	55.3 ± 4.6	80.9 ± 2.5*	($t_{(17)} = 22.22$, $P = 0.0002$)
Teste B	12.4 ± 2.4	20.2 ± 5.4	($t_{(17)} = 1.81$, $P = 0.19$)

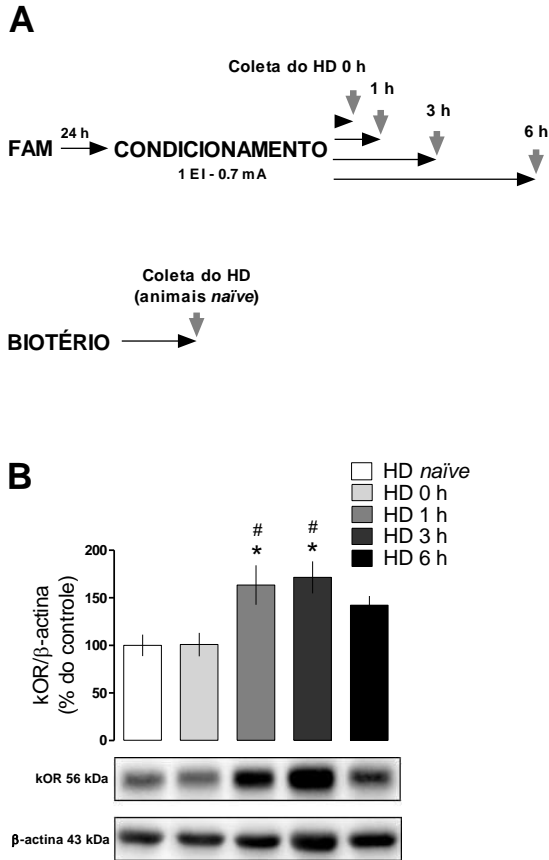
Os valores são expressos como média ± EPM (*n* = 9-10/grupo). * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo.

5.6 EXPERIMENTO 6: O CAC MODERADO AUMENTA A IMUNOMARCAÇÃO DOS HDκORS DURANTE O PERÍODO DE CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo do tempo decorrido entre o final da sessão de condicionamento até o momento da eutanásia na imunomarcação dos HDκORs ($F_{(4,30)} = 5,26$, $P = 0,002$). Como mostrado na **Figura 12B**, o HD dos animais avaliados 1 h e 3 h após o CAC moderado, apresentou um aumento na imunomarcação dos κORs, quando comparado ao grupo *naïve* ($P = 0,02$ e $P = 0,01$, respectivamente) ou ao grupo eutanasiado imediatamente após o CAC ($P = 0,01$ para ambas as comparações).

Assim, esses dados sugerem que os κORs são recrutados no HD em resposta ao condicionamento aversivo contextual moderado, durante o período de consolidação da memória.

Figura 12. Efeito do CAC moderado sobre a imunomarcção de HDκORs durante o período de consolidação da memória.



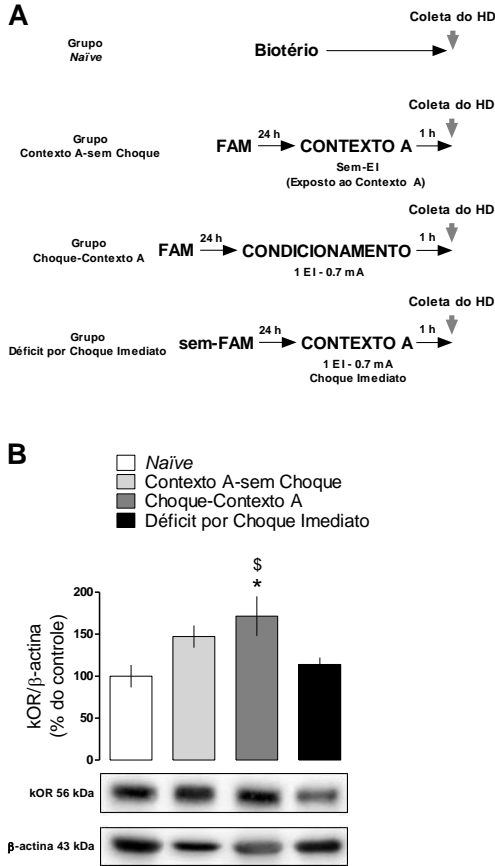
(A) Delineamento experimental utilizado. As setas indicam o ponto no tempo em que ocorreu a dissecação do HD. **(B)** Quantificação da imunomarcção de κORs normalizada pela β-actina e expressa como % do controle (grupo *naïve*); e imagens ilustrativas das bandas obtidas por imunodeteção para o κOR (56 kDa) e para a β-actina (43 kDa). Os valores são expressos como média ± EPM (n = 7/grupo); Quatro experimentos independentes (n = 2 / experimento). * P < 0,05 quando comparado com o grupo *naïve*. # P < 0,05 quando comparado com o grupo eutanasiado imediatamente após o CAC (0 h).

5.7 EXPERIMENTO 7: A EXPERIÊNCIA ASSOCIATIVA AVERSIVA INDUZ AUMENTO DA IMUNOMARCAÇÃO DOS HDKORS DURANTE A CONSOLIDAÇÃO

A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo do condicionamento aversivo na imunomarcação dos HDκORs ($F_{(3,20)} = 4,23$, $P = 0,01$). A **Figura 13B** mostra um aumento na imunomarcação dos HDκORs no grupo que recebeu a experiência associativa (choque-contexto A), quando comparado ao grupo *naïve* ($P = 0,02$) e ao grupo de déficit por choque imediato ($P = 0,04$).

Este resultado sugere que os κORs são substancialmente recrutados no HD após uma experiência aversiva associativa.

Figura 13. Avaliação da especificidade da imunomarcção dos HDκORs na formação da memória associativa.



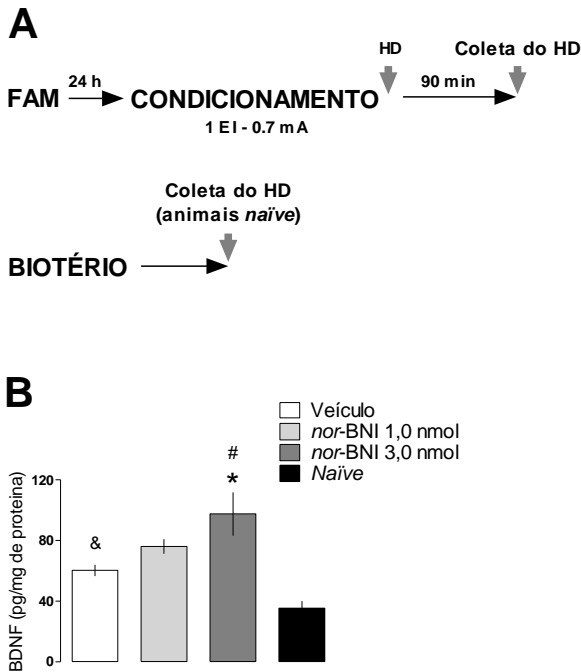
(A) Delineamento experimental utilizado. As setas indicam o momento em que ocorreu a dissecação do HD. **(B)** Quantificação da imunomarcção de κORs normalizada pela β-actina e expressa como % do controle (grupo *naïve*); e imagens ilustrativas das bandas obtidas por imunodeteção para o κOR (56 kDa) e para a β-actina (43 kDa). Os valores são expressos como média ± EPM (n = 6/grupo); Quatro experimentos independentes (n = 2 / experimento). * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo *naïve*. \$ $P < 0,05$ quando comparado com o grupo déficit por choque imediato.

5.8 EXPERIMENTO 8: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS AUMENTA OS NÍVEIS DE BDNF NO HD DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo do tratamento sobre os níveis de BDNF no HD ($F_{(3,16)} = 10,48$, $P = 0,00047$). Como mostrado na **Figura 14B**, os animais tratados com *nor*-BNI na dose de 3,0 nmol apresentaram maiores níveis de BDNF no HD, quando comparados com aqueles que receberam veículo ($P = 0,01$) ou com os animais *naïve* ($P = 0,0004$). Além disso, o grupo veículo apresentou maiores níveis de BDNF, quando comparado com os animais *naïve* ($P = 0,04$).

Esses resultados sugerem que o condicionamento aversivo contextual moderado *per se* aumentou os níveis de BDNF no HD e que a microinfusão de *nor*-BNI foi capaz de induzir um aumento adicional nos níveis desse marcador de plasticidade. Esse resultado indica ainda que o aprendizado aversivo contextual recruta BDNF no HD e sugere uma possível via pela qual a microinfusão de *nor*-BNI conduz à potencialização da consolidação da memória aversiva contextual.

Figura 14. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC moderado sobre os níveis de BDNF hipocampais durante a consolidação da memória.



(A) Delineamento experimental utilizado. As setas indicam o local e o momento do tratamento, bem como, o momento em que ocorreu a dissecação do HD. **(B)** O gráfico mostra os níveis de BDNF (expresso em picogramas de BDNF por miligrama de proteína) presentes no HD de ratos 90 min após o protocolo de CAC moderado e subsequente microinfusão das drogas (exceto o grupo *naïve*). Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 5$ /grupo). * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo. # $P < 0,05$ quando comparado com o grupo *naïve*. & $P < 0,05$ quando comparado com o grupo *naïve*.

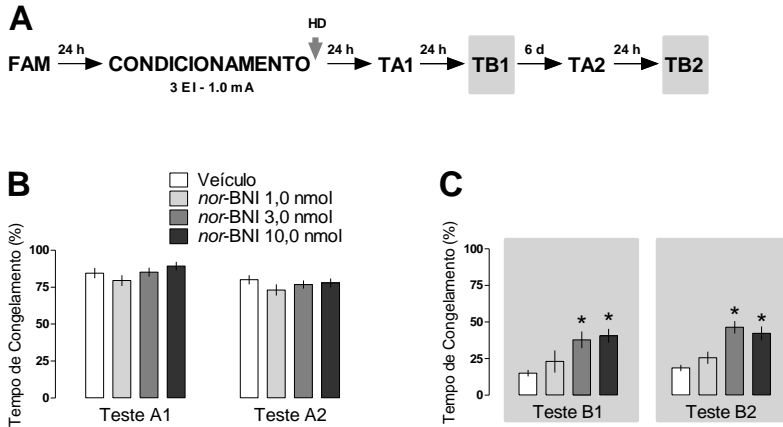
5.9 EXPERIMENTO 9: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS INDUZ A EXPRESSÃO GENERALIZADA DO COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO NO PROTOCOLO DE CAC FORTE

Na análise dos Testes A1 e A2, a ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo da reexposição ao contexto A ($F_{(1,30)} = 10,64$, $P = 0,002$). No entanto, não houve nenhum efeito do tratamento sobre o tempo de congelamento ($F_{(3,30)} = 2,02$, $P = 0,13$) ou uma interação significativa entre os fatores ($F_{(3,30)} = 0,37$, $P = 0,77$). Na **Figura 15B** é possível visualizar que a *nor*-BNI não alterou o tempo de congelamento em ambos os testes.

Na análise dos Testes B1 e B2, a ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do tratamento sobre tempo de congelamento ($F_{(3,30)} = 10,47$, $P = 0,00007$). Não houve efeito significativo da reexposição ao contexto B ($F_{(1,30)} = 1,92$, $P = 0,17$), nem interação significativa entre os fatores ($F_{(3,30)} = 0,27$, $P = 0,83$). A **Figura 15C** mostra que os animais tratados com *nor*-BNI nas doses de 3,0 ou 10,0 nmol apresentaram maior tempo de congelamento durante os Testes B1 e B2, quando comparados com seus respectivos controles (Teste B1: $P = 0,04$ e $P = 0,02$; Teste B2: $P = 0,01$ e $P = 0,04$).

Nossos resultados indicam que o bloqueio farmacológico dos HD κ ORs induz a expressão generalizada do comportamento de congelamento, sugerindo que a ativação endógena desses receptores tem um efeito modulatório inibitório sobre a consolidação de uma memória aversiva contextual forte.

Figura 15. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC forte.



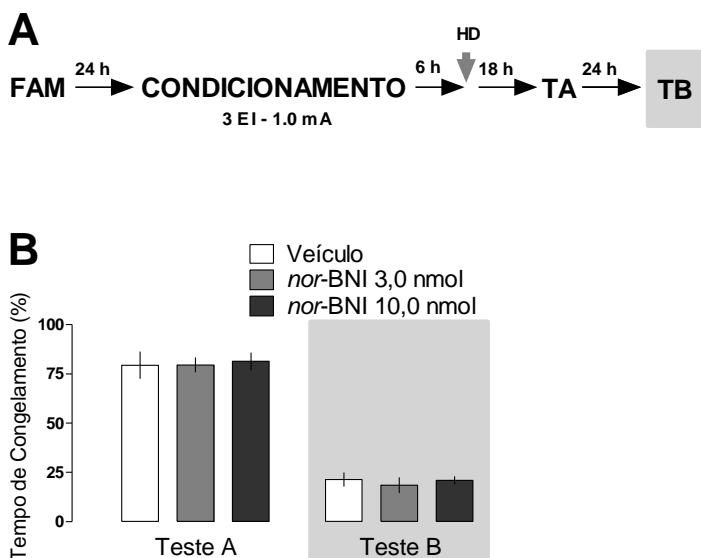
(A) Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. Os gráficos mostram a % do tempo de congelamento quando os animais foram testados **(B)** no contexto pareado (Testes A1 e A2; 1 e 8 dias após o CAC, respectivamente) e **(C)** no contexto não pareado (Testes B1 e B2; 2 e 9 dias após o CAC, respectivamente). Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 8-9$ /grupo). * $P < 0,05$ quando comparado com o respectivo grupo veículo.

5.10 EXPERIMENTO 10: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS κ ORs NÃO TEM EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO QUANDO REALIZADA 6 H APÓS UM CAC FORTE

A ANOVA de uma via não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento sobre o tempo de congelamento no Teste A ($F_{(2,19)} = 0,04$, $P = 0,95$) ou Teste B ($F_{(2,19)} = 0,23$, $P = 0,79$). Como mostrado na **Figura 16B**, todos os grupos apresentaram um tempo de congelamento comparável em ambos os testes.

Portanto, a microinfusão de *nor*-BNI 6 h após a sessão de condicionamento forte não mais foi capaz de induzir generalização do comportamento de congelamento, sugerindo que o recrutamento dos HDκORs é limitado à janela temporal de consolidação da memória aversiva contextual forte.

Figura 16. Efeito da microinfusão do antagonista dos κORs 6 h após um CAC forte.



(A) Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. **(B)** Os gráficos mostram a % do tempo de congelamento nos Testes A e B 18 h e 48 h após o CAC forte, respectivamente. Os dados são expressos como média \pm EPM ($n = 7-8$ /grupo).

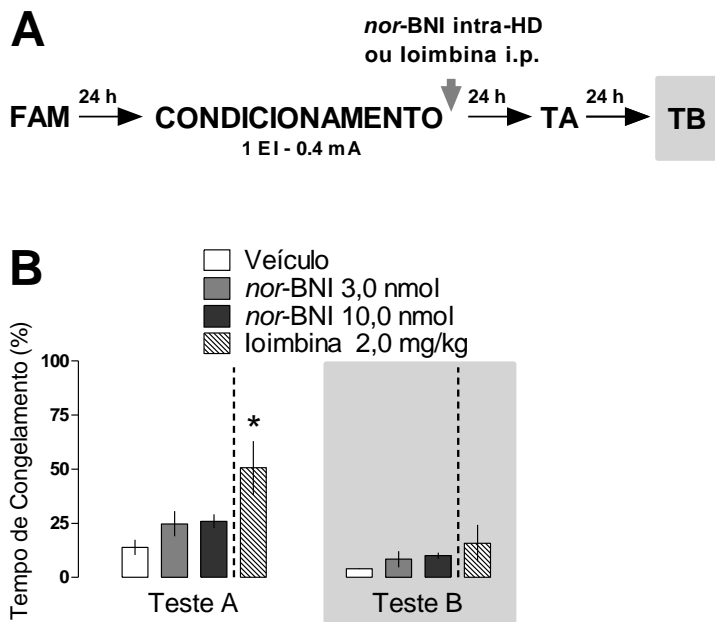
5.11 EXPERIMENTO 11: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS NÃO AFETA A EXPRESSÃO DE CONGELAMENTO NO PROTOCOLO DE CAC FRACO

Como mostrado na **Figura 17B**, a ANOVA de uma via não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento com *nor*-BNI

sobre o tempo de congelamento durante o Teste A ($F_{(2, 18)} = 2,71$, $P = 0,09$) ou Teste B ($F_{(2,18)} = 2,43$, $P = 0,11$). Por outro lado, o teste t de Student mostrou uma diferença significativa entre o grupo tratado com ioimbina e o grupo veículo no Teste A ($t_{(11)} = 9,22$, $P = 0,01$), sendo que os animais do grupo ioimbina apresentaram maior tempo de congelamento quando comparados com os animais do grupo de veículo ($P = 0.01$). Por fim, o teste t de Student não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento com ioimbina no tempo de congelamento durante o Teste B ($t_{(11)} = 2,31$, $P = 0,15$).

Em conjunto, estes resultados sugerem que a ativação dos HDkORs não é requerida, pelo menos não de maneira substancial, para modular o processo de consolidação de uma memória aversiva contextual fraca.

Figura 17. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após um CAC fraco.



(A) Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. **(B)** Os gráficos mostram a % do tempo de congelamento durante os testes A e B realizados 24 h e 48 h após o CAC fraco, respectivamente. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 6/\text{grupo}$). * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo.

5.12 EXPERIMENTO 12: A MICROINFUSÃO DO AGONISTA DOS K_2 ORs PREJUDICA A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA APÓS O CAC FORTE

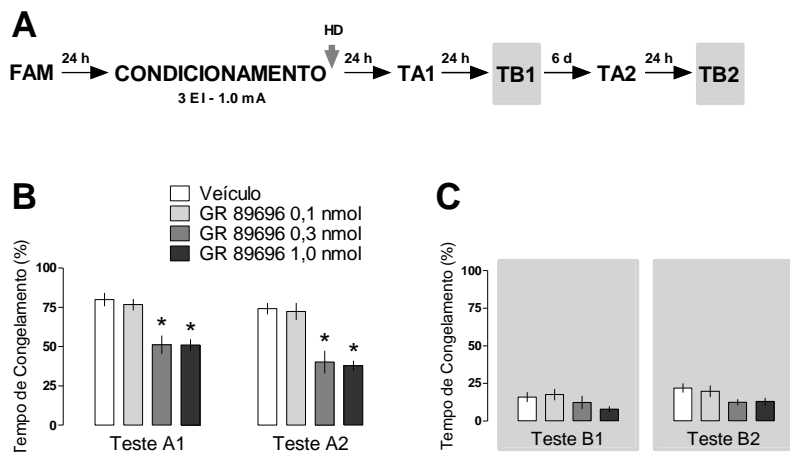
A ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do tratamento ($F_{(3,29)} = 17,27$, $P = 0,000001$) e da reexposição ao contexto A ($F_{(1,29)} = 11,83$, $P = 0,001$) sobre o tempo de congelamento durante os Testes A. No entanto, nenhuma interação entre os fatores foi encontrada ($F_{(3,29)} = 0,69$, $P = 0,55$). Como mostrado na **Figura 18B**, os animais tratados

com o GR 89696 nas doses de 0,3 e 1,0 nmol apresentaram menor tempo de congelamento nos Testes A1 e A2, quando comparados aos respectivos controles (Teste A1: $P = 0,01$ e $P = 0,02$; Teste A2: $P = 0,003$ e $P = 0,002$).

Na análise dos Testes B1 e B2, a ANOVA de medidas repetidas não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento ($F_{(3,29)} = 2,84$, $P = 0,05$), da reexposição ao contexto B ($F_{(1,29)} = 2,94$, $P = 0,09$), nem da interação entre os fatores ($F_{(3,29)} = 0,48$, $P = 0,69$), sobre o tempo de congelamento. Conforme apresentado na **Figura 18C**, todos os grupos apresentaram uma quantidade semelhante de congelamento em ambos os testes.

Estes resultados sugerem que a ativação dos HDK₂ORs modula negativamente a consolidação de uma memória aversiva contextual forte.

Figura 18. Efeito do agonista seletivo dos k_2 ORs imediatamente após um CAC forte.



(A) Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. Os gráficos mostram a % do tempo de congelamento quando os animais foram testados **(B)** no contexto pareado (Testes A1 e A2; 1 e 8 dias após o CAC, respectivamente) e **(C)** no contexto não pareado (Testes B1 e B2; 2 e 9 dias após o CAC, respectivamente). Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 8-9$ / grupo). * $P < 0,05$ quando comparado com o respectivo grupo veículo.

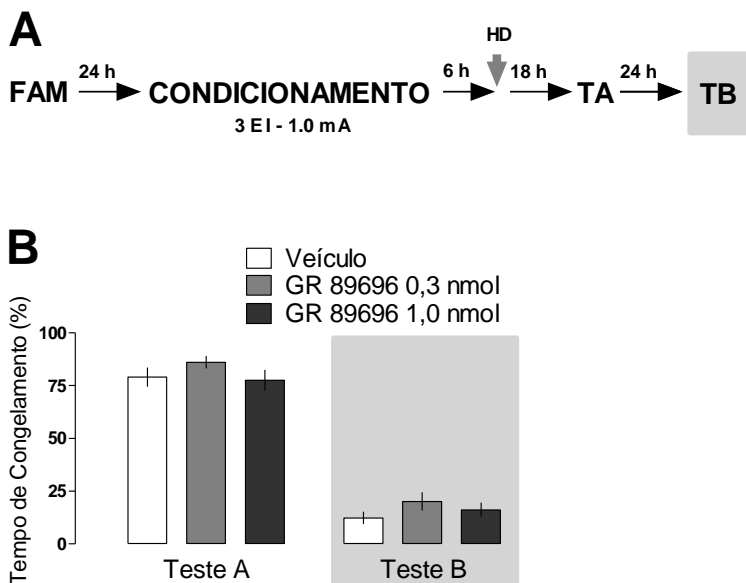
5.13 EXPERIMENTO 13: A MICROINFUSÃO DO AGONISTA DOS K_2 ORs NÃO TEM EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO QUANDO REALIZADA 6 H APÓS UM CAC FORTE

A ANOVA de uma via não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento sobre o tempo de congelamento no Teste A ($F_{(2,25)} = 1,15$, $P = 0,33$) ou Teste B ($F_{(2,25)} = 1,18$, $P = 0,32$). Conforme mostrado na **Figura 19B**, todos os grupos apresentaram uma quantidade semelhante de tempo de congelamento em ambos os testes.

Nossos resultados mostraram que a ativação dos HD k_2 ORs 6 h após o condicionamento forte não foi capaz de

afetar o tempo de congelamento, sugerindo que o envolvimento desse receptor é restrito à janela temporal de consolidação da memória aversiva contextual forte.

Figura 19. Efeito do agonista seletivo dos κ_2 ORs 6 h após um CAC forte.



(A) Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. **(B)** O gráfico mostra a % do tempo de congelamento durante os testes A e B realizados 18 h e 48 h após o CAC forte. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 9-10$ /grupo).

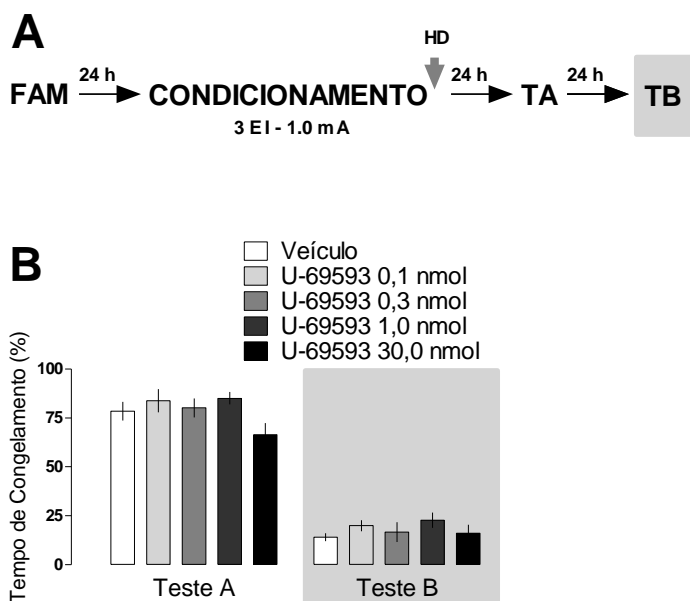
5.14 EXPERIMENTO 14: A MICROINFUSÃO DO AGONISTA DOS κ_1 ORs NÃO TEM EFEITO SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

A ANOVA de uma via não mostrou nenhum efeito do tratamento sobre o tempo de congelamento no Teste A ($F_{(4,38)} = 2,08$, $P = 0,10$) ou Teste B ($F_{(4,38)} = 0,94$, $P = 0,44$). Como

mostrado na **Figura 20B**, nas doses testadas, o U-69593 não induziu alterações no tempo de congelamento dos animais em ambos os testes.

Este resultado sugere que a ativação dos HDK₁ORs não é crítica para modular a consolidação da memória de um CAC forte.

Figura 20. Efeito do agonista seletivo dos κ_1 ORs imediatamente após um CAC forte.



(A) Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. **(B)** Os gráficos mostram a % do tempo de congelamento durante os Testes A e B realizados 24 h e 48 h após o CAC forte, respectivamente. Os valores são expressos como média \pm EPM (n = 8-10/grupo).

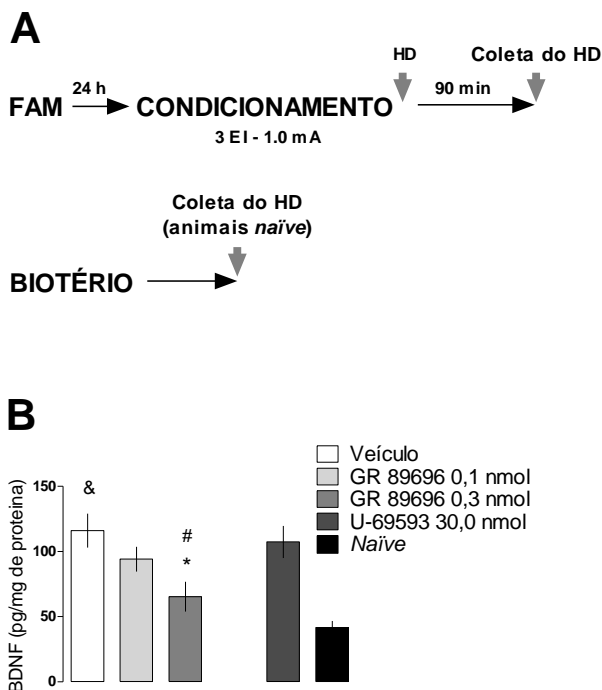
5.15 EXPERIMENTO 15: A MICROINFUSÃO DO AGONISTA DOS K_2 ORS DIMINUI OS NÍVEIS DE BDNF NO HD DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo do tratamento sobre os níveis de BDNF no HD ($F_{(4,20)} = 8,36$, $P = 0,0003$). Como demonstrado na **Figura 21B**, os animais tratados com o GR 89696 na dose de 0,3 nmol apresentaram menores níveis de BDNF no HD, quando comparados com aqueles que receberam veículo ($P = 0,01$) ou U-69593 ($P = 0,02$). Além disso, o grupo veículo apresentou maiores níveis de BDNF quando comparado com o grupo *naïve* ($P = 0,0008$).

Esses resultados mostram que o condicionamento aversivo contextual forte *per se* aumentou os níveis de BDNF no HD, enquanto que os animais tratados com o agonista seletivo dos κ_2 ORs, mas não dos κ_1 ORs, apresentaram menores níveis desse marcador de plasticidade.

Esses resultados indicam que o aprendizado aversivo contextual forte recruta BDNF na região do HD e sugere uma possível via pela qual a microinfusão de GR 89696 conduz ao prejuízo da consolidação da memória aversiva contextual.

Figura 21. Efeito do agonista dos κ_2 ORs imediatamente após um CAC forte sobre os níveis de BDNF hipocampais durante a consolidação da memória.



(A) Delineamento experimental utilizado. As setas indicam o local e o momento do tratamento, bem como, o momento em que ocorreu a dissecação do HD. **(B)** O gráfico mostra os níveis de BDNF (expresso em picogramas de BDNF por miligrama de proteína) presentes no HD de ratões 90 min após o protocolo de CAC forte e subsequente microinfusão das drogas (exceto o grupo *naïve*). Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 5/\text{grupo}$). * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo. # $P < 0,05$ quando comparado com o grupo U-69593. & $P < 0,05$ quando comparado com o grupo *naïve*.

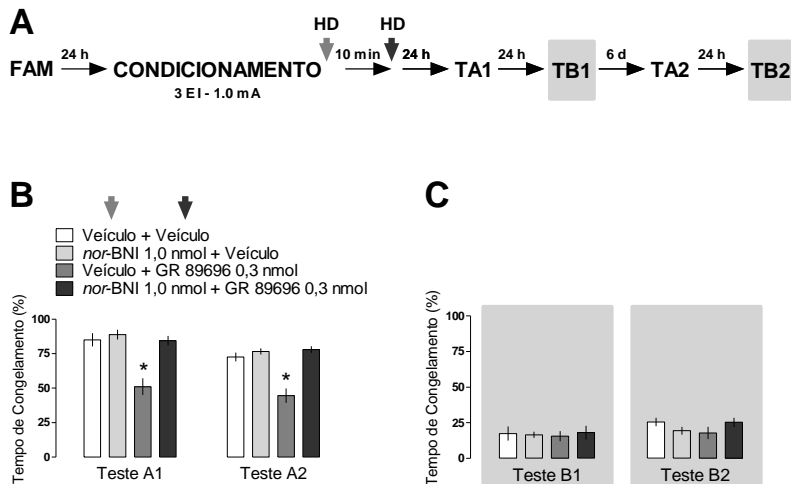
5.16 EXPERIMENTO 16: O PRÉ-TRATAMENTO COM *NOR*-BNI PREVINDE O PREJUÍZO DE CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA INDUZIDO PELO GR 89696 NO PROTOCOLO DE CAC FORTE

Na análise dos Testes A1 e A2, a ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostrou uma interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento sobre o tempo de congelamento ($F_{(1,28)} = 15,64$, $P = 0,0004$). Como mostrado na **Figura 22B**, o grupo tratado com GR 89696 apresentou menor tempo de congelamento quando comparado ao grupo veículo + veículo (Teste A1: $P = 0,001$; Teste A2: $P = 0,002$), ao grupo *nor*-BNI + veículo (Teste A1: $P = 0,0005$; Teste A2: $P = 0,001$) e ao grupo *nor*-BNI + GR 89696 (Teste A1: $P = 0,001$; Teste A2: $P = 0,001$). Além disso, o efeito do GR 89696 não foi mais observado quando os animais foram pré-tratados com uma dose subefetiva de *nor*-BNI (*nor*-BNI + GR 89696 vs veículo + veículo = Teste A1: $P = 0,93$; Teste A2: $P = 0,75$).

Na análise dos Testes B1 e B2, a ANOVA de duas vias de medidas repetidas não mostrou nenhum efeito do pré-tratamento ($F_{(1,28)} = 0,06$, $P = 0,80$), do tratamento ($F_{(1,28)} = 0,03$, $P = 0,84$), nem da interação entre os fatores ($F_{(1,28)} = 2,20$, $P = 0,14$), sobre o tempo de congelamento. Conforme ilustrado na **Figura 22C**, todos os grupos apresentaram uma quantidade semelhante de tempo de congelamento em ambos os testes.

Em resumo, uma dose subefetiva de *nor*-BNI foi capaz de prevenir o prejuízo de consolidação da memória induzido pelo GR 89696, sugerindo que os efeitos do GR 89696 foram mediados pela ativação dos HDkORs.

Figura 22. Efeito do pré-tratamento com *nor*-BNI sobre o prejuízo de consolidação da memória induzido pelo GR 89696.



(A) Delineamento experimental utilizado. As setas indicam o local e o momento do tratamento. Os gráficos mostram a % de tempo de congelamento quando os animais foram testados **(B)** no contexto pareado (Testes A1 e A2; 1 e 8 dias após CAC, respectivamente) ou **(C)** no contexto não pareado (Testes B1 e B2; 2 e 9 dias após o CAC, respectivamente). As cores das setas indicam a ordem das drogas microinfundidas. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 7-9/\text{grupo}$). * $P < 0,05$ quando comparado com os demais grupos no determinado teste (Teste A1 ou A2).

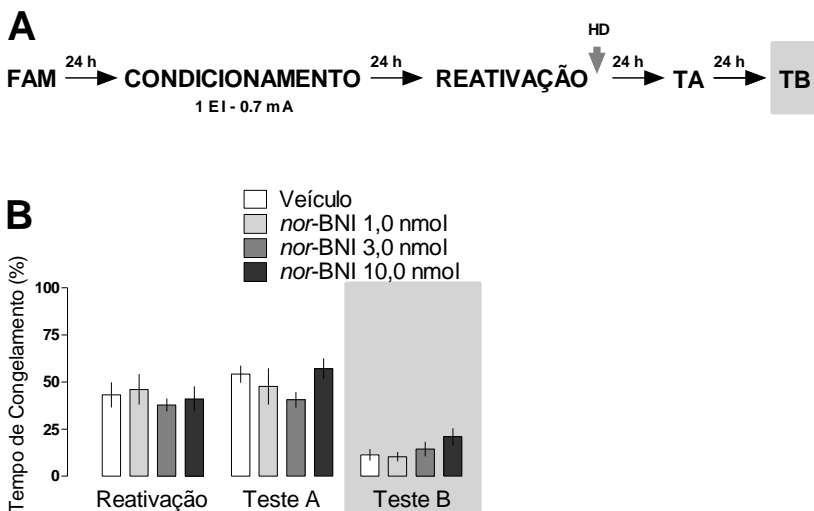
5.17 EXPERIMENTO 17: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS APÓS A REATIVAÇÃO NÃO AFETA O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO NO PROTOCOLO DE CAC MODERADO

A ANOVA de medidas repetidas não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento ($F_{(4,30)} = 1,32$, $P = 0,28$), da reexposição ao contexto A ($F_{(1,30)} = 1,43$, $P = 0,23$) ou da interação entre os fatores ($F_{(4,30)} = 2,24$, $P = 0,08$). Como mostrado na **Figura 23B**, a *nor*-BNI não induziu alterações no tempo de congelamento no Teste A.

Além disso, a ANOVA de uma via também não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento ($F_{(4,30)} = 1,38$, $P = 0,26$) sobre o tempo de congelamento no Teste B.

Nossos resultados mostraram que o antagonismo dos HD κ ORs imediatamente após a reativação não teve efeito sobre o comportamento de congelamento, sugerindo que a participação desses receptores não é requerida para a reconsolidação de uma memória aversiva contextual moderada.

Figura 23. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC moderado.



(A) Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. **(B)** O gráfico mostra a % do tempo de congelamento durante os Testes A e B realizados 24 h e 48 h após a sessão de reativação da memória, respectivamente. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 7-8$ /grupo).

5.18 EXPERIMENTO 18: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS IMEDIATAMENTE APÓS A REATIVAÇÃO INDUZ A EXPRESSÃO GENERALIZADA DO COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO NO PROTOCOLO DE CAC FORTE

A ANOVA de medidas repetidas não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento ($F_{(4,34)} = 2,57$, $P = 0,05$) sobre o comportamento de congelamento nos testes A. Adicionalmente, embora tenha sido revelado um efeito significativo das reexposições ao contexto A ($F_{(2,68)} = 9,64$, $P = 0,0002$), não houve interação significativa entre os fatores ($F_{(8,68)} = 0,63$, $P = 0,74$). Como mostrado na **Figura 24B**, a *nor*-BNI não induziu alterações no tempo de congelamento durante os Testes A1 e A2.

Por outro lado, a ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do tratamento ($F_{(4,34)} = 12,86$, $P = 0,000001$) e das reexposições ao contexto B ($F_{(1,34)} = 24,57$, $P = 0,00002$), mas não da interação entre os fatores ($F_{(4,34)} = 0,63$, $P = 0,64$), sobre o tempo de congelamento nos testes B. A **Figura 24C** mostra que os animais tratados com a *nor*-BNI, na dose de 1,0 nmol, apresentaram maior tempo de congelamento durante os Testes B1 e B2 quando comparados com seus respectivos controles (Teste B1: $P = 0,007$; Teste B2: $P = 0,03$).

Nossos resultados mostraram que o antagonismo farmacológico dos HDkORs após a reativação de uma memória forte induziu a expressão generalizada do comportamento de congelamento, sugerindo que a ativação endógena dos HDkORs modula negativamente a reconsolidação de uma memória aversiva contextual forte.

5.19 EXPERIMENTO 19: A MICROINFUSÃO DO ANTAGONISTA DOS KORS NÃO TEM EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO QUANDO REALIZADA 6 H APÓS A REATIVAÇÃO NO PROTOCOLO DE CAC FORTE

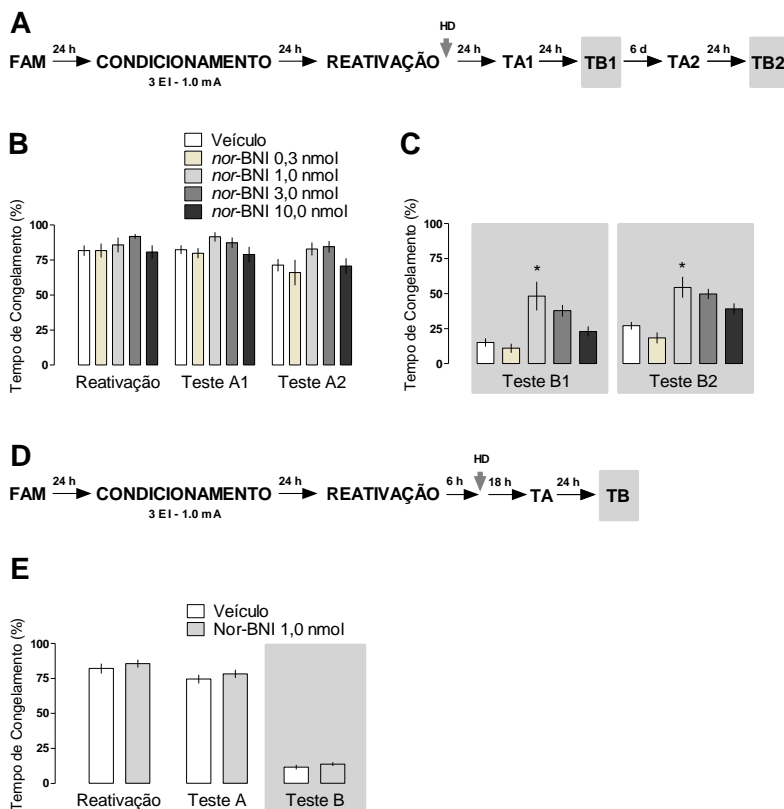
A ANOVA de medidas repetidas não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento sobre o comportamento de congelamento no Teste A ($F_{(1,14)} = 1,08$, $P = 0,31$). Adicionalmente, houve um efeito significativo da reexposição ao

contexto A ($F_{(1,14)} = 7,44$, $P = 0,01$), mas nenhuma interação entre os fatores foi revelada ($F_{(1,14)} = 0,002$, $P = 0,96$). Como mostrado na **Figura 24E**, os dois grupos experimentais apresentaram um tempo de congelamento comparável.

O teste t de Student não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento sobre o tempo de congelamento no Teste B ($t_{(14)} = 1,02$, $P = 0,32$), tal como apresentado na **Figura 24E**.

Esses resultados sugerem que o envolvimento dos HD κ ORs é limitado à janela temporal de reconsolidação da memória aversiva contextual forte.

Figura 24. Efeito da microinfusão do antagonista dos κ ORs imediatamente ou 6 h após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC forte.



(A) Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. Os gráficos mostram a % do tempo de congelamento quando os animais foram testados **(B)** no contexto pareado (Testes A1 e A2; 1 e 8 dias após a sessão de reativação, respectivamente) e **(C)** no contexto não pareado (Testes B1 e B2; 2 e 9 dias após a sessão de reativação, respectivamente). **(D)** Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. **(E)** O gráfico mostra a % do tempo de congelamento durante os testes A e B realizados 18 h e 48 h após a sessão de reativação, respectivamente. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 7-9$ /grupo para o experimento 18; $n = 8$ /grupo para o experimento 19). * $P < 0,05$ quando comparado com o respectivo grupo veículo.

5.20 EXPERIMENTO 20: A MICROINFUSÃO DO AGONISTA DOS K_2 ORS APÓS A REATIVAÇÃO DIMINUI A EXPRESSÃO DE CONGELAMENTO NO PROTOCOLO DE CAC FORTE

A ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do tratamento ($F_{(3,29)} = 7,95$, $P = 0,0005$), das reexposições ao contexto A ($F_{(2,58)} = 70,83$, $P = 0,000001$) e da interação entre os fatores ($F_{(6,58)} = 6,85$, $P = 0,00002$) sobre o tempo de congelamento. Como mostrado na **Figura 25B**, os animais tratados com o GR 89696, em todas as doses testadas, apresentaram menor tempo de congelamento nos Testes A1 e A2 em comparação com os respectivos grupos veículos [Teste A1 = (0,1 nmol: $P = 0,01$, 0,3 nmol: $P = 0,01$ e 1,0 nmol: $P = 0,01$) e Teste A2 = (0,1 nmol: $P = 0,005$, 0,3 nmol: $P = 0,02$ e 1,0 nmol: $P = 0,02$)] e ao próprio grupo na sessão de reativação [Teste A1 = (0,1 nmol: $P = 0,0001$, 0,3 nmol: $P = 0,0001$ e 1,0 nmol: $P = 0,0001$) e Teste A2 = (0,1 nmol: $P = 0,0005$, 0,3 nmol: $P = 0,0001$ e 1,0 nmol: $P = 0,0001$)].

A ANOVA de medidas repetidas não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento ($F_{(3,29)} = 0,17$, $P = 0,91$) sobre o tempo de congelamento nos Testes B1 e B2. Adicionalmente, houve um efeito significativo das reexposições ao contexto B ($F_{(1,29)} = 10,99$, $P = 0,002$), mas nenhuma interação entre os fatores foi revelada ($F_{(3,29)} = 0,71$, $P = 0,54$). Conforme apresentado na **Figura 25C**, todos os grupos mostraram uma quantidade semelhante de congelamento durante os Testes B1 e B2.

Em conjunto, esses resultados sugerem que a ativação dos HDK₂ORs imediatamente após a reativação promove uma modulação negativa sobre a reconsolidação de uma memória aversiva contextual forte.

5.21 EXPERIMENTO 21: A MICROINFUSÃO DO AGONISTA DOS K_2 ORS NÃO TEM EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO QUANDO REALIZADA 6 H APÓS A REATIVAÇÃO NO PROTOCOLO DE CAC FORTE

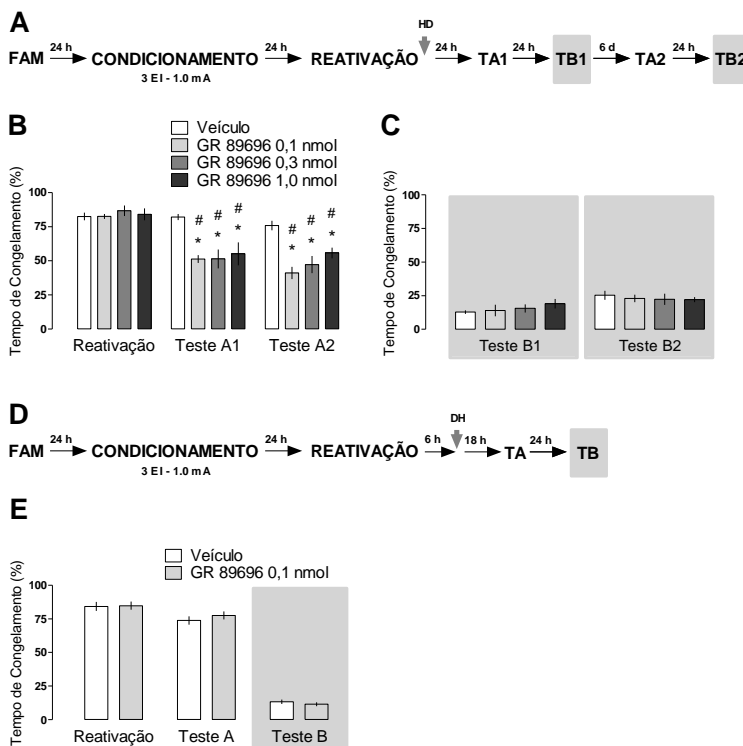
A ANOVA de medidas repetidas não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento sobre o comportamento de

congelamento no Teste A ($F_{(1,15)} = 0,41$, $P = 0,52$). Adicionalmente, houve um efeito significativo da reexposição ao contexto A ($F_{(1,15)} = 9,48$, $P = 0,007$), mas nenhuma interação entre os fatores ($F_{(1,15)} = 0,29$, $P = 0,59$). Como mostrado na **Figura 25E**, os dois grupos experimentais apresentaram um tempo de congelamento comparável no Teste A.

O teste t de Student não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento sobre o tempo de congelamento no Teste B ($t_{(15)} = 0,60$, $P = 0,44$), tal como apresentado na **Figura 25E**.

Em resumo, a ativação dos HD κ_2 ORs 6 h após a reativação não foi capaz de afetar o tempo de congelamento, sugerindo que o envolvimento desse receptor é limitado à janela temporal de reconsolidação da memória aversiva contextual forte.

Figura 25. Efeito do agonista dos κ_2 ORs imediatamente ou 6 h após a reativação sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC forte.



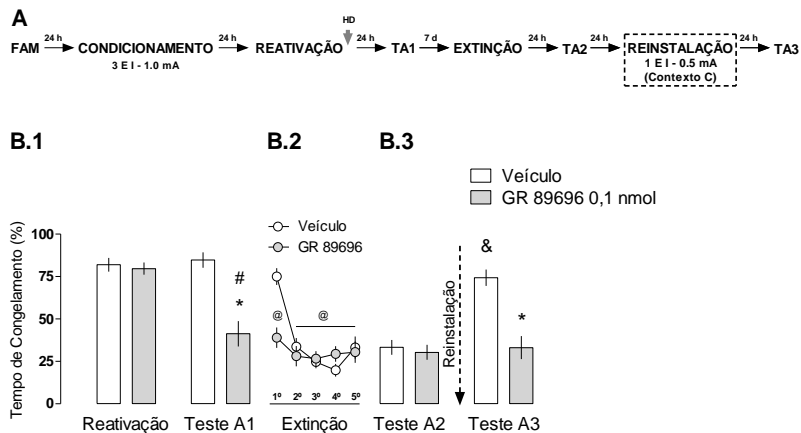
(A) Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. Os gráficos mostram a % do tempo de congelamento quando os animais foram testados **(B)** no contexto pareado (Testes A1 e A2; 1 e 8 dias após a sessão de reativação, respectivamente) e **(C)** no contexto não pareado (Testes B1 e B2; 2 e 9 dias após a sessão de reativação, respectivamente). **(D)** Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. **(E)** O gráfico mostra a % do tempo de congelamento durante os testes A e B realizados 18 h e 48 h após a sessão de reativação, respectivamente. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 8-9$ /grupo para experimento 20; $n = 8-9$ /grupo para o experimento 21). * $P < 0,05$ quando comparado com o respectivo grupo veículo. # $P < 0,05$ quando comparado com o próprio grupo na sessão de reativação.

5.22 EXPERIMENTO 22: A MICROINFUSÃO DO AGONISTA DOS K₂ORS PROMOVE PREJUÍZO DE RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA NO PROTOCOLO DE CAC FORTE

A ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do tratamento ($F_{(1,15)} = 22,05$, $P = 0,0002$), das reexposições ao contexto A ($F_{(3,45)} = 44,05$, $P = 0,000001$) e da interação entre os fatores ($F_{(3,45)} = 13,51$, $P = 0,000001$) sobre o comportamento de congelamento. Como mostrado na **Figura 26B.1**, os animais tratados com GR 89696 0,1 nmol apresentaram menor tempo de congelamento no Teste A1, quando comparados com o grupo veículo ($P = 0,003$) e com o próprio grupo na sessão de reativação ($P = 0,0001$). Na sessão de extinção, a ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo da interação entre os fatores ($F_{(4,60)} = 10,11$, $P = 0,000001$). Conforme apresentado na **Figura 26B.2**, ambos os grupos, veículo e GR 89696, apresentaram menor congelamento em todos os blocos quando comparados com o 1º bloco do grupo veículo ($P < 0,05$), incluindo o 1º bloco do grupo GR 89696 ($P = 0,01$). Além disso, após a extinção, o grupo veículo continuou apresentando níveis reduzidos e comparáveis aos do grupo GR 89696, tal como mostrado no Teste A2 (ANOVA de medidas repetidas; $P = 0,95$) (**Figura 26B.3**). Por fim, após a sessão de reinstalação, o grupo veículo, mas não o grupo GR 89696, reinstalou a resposta condicionada de congelamento (grupo veículo no Teste A3 vs grupo veículo no Teste A2: $P = 0,0001$) (**Figura 26B.3**).

Em conjunto, esses resultados indicam que a microinfusão de GR 89696 imediatamente após a reativação prejudica a reconsolidação da memória no protocolo de CAC forte.

Figura 26. Efeito do agonista dos κ_2 ORs imediatamente após a reativação no protocolo de reinstalação.



(A) Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. Os gráficos mostram a % do tempo de congelamento quando os animais foram **(B.1)** testados no contexto pareado (Teste A1; 24 h após a sessão de reativação), **(B.2)** submetidos a sessão de extinção (5 blocos de 3 min cada, totalizando 15 min) e **(B.3)** novamente testados no contexto pareado antes e 24 h após a sessão de reinstalação (Teste A2 e Teste A3, respectivamente). Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 8-9$ /grupo). * $P < 0,05$ quando comparado com o respectivo grupo veículo. # $P < 0,05$ quando comparado com o próprio grupo na sessão de reativação. @ $P < 0,05$ quando comparado com o 1º bloco de extinção do grupo veículo. & $P < 0,05$ quando comparado com o próprio grupo no Teste A2.

5.23 EXPERIMENTO 23: O PRÉ-TRATAMENTO COM NOR-BNI PREVINDE O PREJUÍZO DE RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA INDUZIDO PELO GR 89696 NO PROTOCOLO DE CAC FORTE

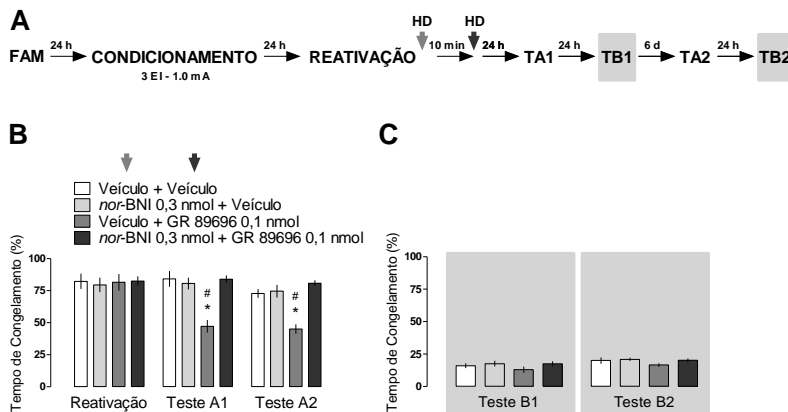
A ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostrou uma interação significativa entre o pré-tratamento, o tratamento e as

reexposições ao contexto A ($F_{(2,60)} = 14,08$, $P = 0,00001$) sobre o tempo de congelamento nos Testes A1 e A2. Como mostrado na **Figura 27B**, o grupo tratado com GR 89696 apresentou menor tempo de congelamento comparado ao grupo veículo + veículo (Teste A1: $P = 0,03$; Teste A2: $P = 0,02$), grupo *nor*-BNI + veículo (Teste A1: $P = 0,02$; Teste A2: $P = 0,03$), grupo *nor*-BNI + GR 89696 (Teste A1: $P = 0,03$; Teste A2: $P = 0,02$) e ao próprio grupo na sessão de reativação (Teste A1: $P = 0,0001$; Teste A2: $P = 0,0001$). Por outro lado, o efeito do GR 89696 não foi mais observado quando os animais foram pré-tratados com uma dose subefetiva de *nor*-BNI (*nor*-BNI + GR 89696 vs veículo + veículo = Teste A1: $P = 0,97$; Teste A2: $P = 0,93$).

Na análise dos Testes B1 e B2, a ANOVA de duas vias de medidas repetidas não mostrou nenhum efeito significativo do pré-tratamento ($F_{(1,30)} = 3,09$, $P = 0,08$) ou do tratamento ($F_{(1,30)} = 1,30$, $P = 0,24$) sobre o tempo de congelamento. Ainda, embora tenha sido revelado um efeito significativo das reexposições ao contexto B ($F_{(1,30)} = 9,06$, $P = 0,005$), nenhuma interação entre os fatores foi demonstrada ($F_{(1,30)} = 0,001$, $P = 0,97$). Como mostrado na **Figura 27C**, todos os grupos experimentais apresentaram um tempo de congelamento comparável durante os testes.

Em resumo, a microinfusão de uma dose subefetiva de *nor*-BNI foi capaz de prevenir o prejuízo de reconsolidação da memória induzido pelo GR 89696, sugerindo que os efeitos do GR 89696 são mediados pela ativação dos κ ORs.

Figura 27. Efeito do pré-tratamento com *nor*-BNI sobre o prejuízo de reconsolidação da memória induzido pelo GR 89696.



(A) Delineamento experimental utilizado. As setas indicam o local e o momento do tratamento. Os gráficos mostram a % de tempo de congelamento quando os animais foram testados **(B)** no contexto pareado (Testes A1 e A2; 1 e 8 dias após a sessão de reativação, respectivamente) ou **(C)** no contexto não pareado (Testes B1 e B2; 2 e 9 dias após a sessão de reativação, respectivamente). As cores das setas indicam a ordem das drogas microinfundidas. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 8-9$ /grupo). * $P < 0,05$ quando comparado com os demais grupos no determinado teste (Teste A1 ou A2). # $P < 0,05$ quando comparado com o próprio grupo na sessão de reativação.

5.24 EXPERIMENTO 24: A MICROINFUSÃO DE *NOR*-BNI IMEDIATAMENTE APÓS A REATIVAÇÃO NÃO ALTERA O ESTADO MOTIVACIONAL DOS ANIMAIS NO TESTE DE BORRIFAGEM COM SACAROSE

Como esperado, a ANOVA de um via com medidas repetidas não mostrou nenhuma diferença significativa do tratamento ($F_{(1,14)} = 0,37$, $P = 0,54$), da reexposição ao contexto A ($F_{(1,14)} = 0,17$, $P = 0,68$), e nem da interação entre os fatores

($F_{(1,14)} = 0,79$, $P = 0,38$), sobre o tempo de congelamento no Teste A (**Figura 28B**).

Quanto ao teste de borrifagem de sacarose, a ANOVA de uma via não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento sobre o tempo de autolimpeza ($F_{(2,21)} = 0,78$, $P = 0,46$) ou sobre o tempo para a primeira autolimpeza ($F_{(2,21)} = 0,04$, $P = 0,95$). Como mostrado na **Figura 28C**, os grupos experimentais apresentaram um tempo comparável de autolimpeza, bem como do tempo para a execução da primeira autolimpeza no teste de borrifagem com sacarose.

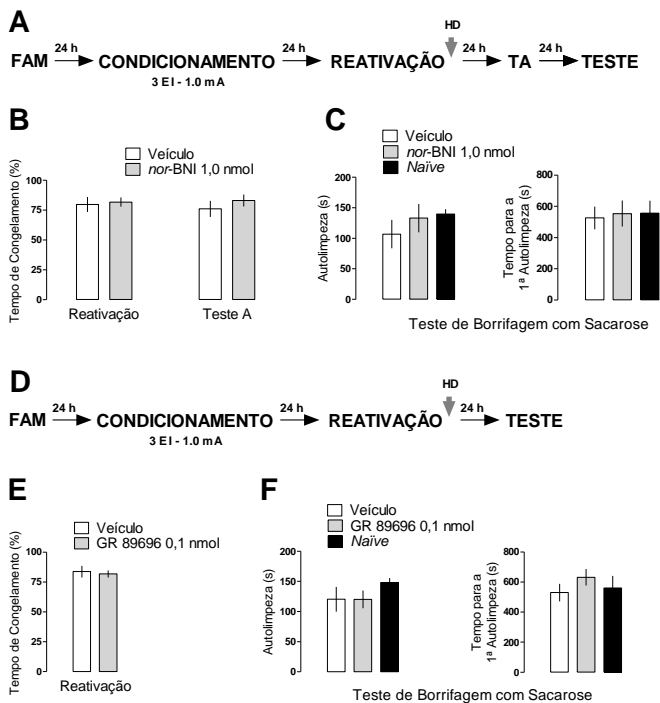
Em resumo, os resultados sugerem que a microinfusão de *nor*-BNI no HD não é capaz de induzir alterações no estado motivacional do animal, as quais poderiam interferir nos testes mnemônicos.

5.25 EXPERIMENTO 25: A MICROINFUSÃO DE GR 89696 IMEDIATAMENTE APÓS A REATIVAÇÃO NÃO ALTERA O ESTADO MOTIVACIONAL DOS ANIMAIS NO TESTE DE BORRIFAGEM COM SACAROSE

Como esperado, o teste *t* de Student não mostrou nenhuma diferença significativa entre os grupos no tempo de congelamento durante a sessão de reativação ($t_{(1,15)} = 0,12$, $P = 0,72$) (**Figura 28E**). Quanto ao teste de borrifagem de sacarose, a ANOVA de uma via não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento sobre o tempo de autolimpeza ($F_{(2,22)} = 1,07$, $P = 0,35$) ou sobre o tempo para a primeira autolimpeza ($F_{(2,22)} = 0,66$, $P = 0,52$). Como mostrado na **Figura 28F**, os grupos experimentais apresentaram um tempo comparável de autolimpeza, bem como do tempo para a execução da primeira autolimpeza.

Os resultados sugerem que a microinfusão de GR 89696 no HD não é capaz de induzir alterações no estado motivacional dos animais.

Figura 28. Efeito da microinfusão intra-HD de *nor*-BNI ou de GR 89696 imediatamente após a sessão de reativação no teste de borrifagem com sacarose.



(A) Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. **(B)** Os gráficos mostram a % de tempo de congelamento quando os animais foram submetidos a sessão de reativação e posteriormente foram testados no contexto pareado (Teste A; 1 dia após a sessão de reativação). **(C)** Os gráficos mostram o tempo total de autolimpeza (expresso em segundos; 15 min de teste) (painel à esquerda) e o tempo para a 1ª autolimpeza (expresso em segundos) (painel à direita). **(D)** Delineamento experimental utilizado. A seta indica o local e o momento do tratamento. **(E)** O gráfico mostra a % de tempo de congelamento quando os animais foram submetidos a sessão de reativação. **(F)** Os gráficos mostram o tempo total de autolimpeza (expresso em segundos; 15 min de teste) (painel à esquerda) e o tempo para a 1ª autolimpeza (expresso em segundos) (painel à direita). Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 8$ /grupo para o experimento 24; $n = 8-9$ /grupo para experimento 25).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos a participação dos HD κ ORs na consolidação e reconsolidação da memória aversiva contextual com diferentes intensidades e especificidades. Em relação à consolidação, foi demonstrado que uma única microinfusão intra-HD do antagonista seletivo dos κ ORs, a *nor*-BNI, imediatamente após o CAC moderado, mas não o CAC fraco, induziu um aumento na resposta de congelamento no contexto pareado. Entretanto, não houve nenhuma alteração nesse parâmetro quando essa droga foi administrada somente 6 h após o CAC moderado ou na ausência da experiência associativa de choque-contexto. Adicionalmente, a microinfusão de *nor*-BNI aumentou os níveis de BDNF no HD 90 min após o CAC moderado, sugerindo que esta pode ser uma possível via pela qual o antagonismo dos HD κ ORs levou à potencialização da consolidação.

Também relatamos o aumento da imunomarcagem dos κ ORs na região do HD 1 h e 3 h após os animais serem expostos à experiência aversiva contextual. No protocolo de CAC forte, a *nor*-BNI aumentou o tempo de congelamento dos animais durante a exposição ao contexto novo e não pareado, indicando que os HD κ ORs também modulam negativamente a consolidação de uma memória mais intensa e generalizada. O presente estudo também demonstrou que a microinfusão intra-HD de GR 89696 (agonista dos κ_2 ORs), mas não do U-69593 (agonista dos κ_1 ORs), prejudicou a consolidação da memória após o CAC forte, sendo esse efeito prevenido pelo pré-tratamento com *nor*-BNI em uma dose subefetiva. O efeito do GR 89696 parece estar relacionado a uma diminuição dos níveis de BDNF no HD, a qual foi encontrada 90 min após a microinfusão intra-HD dessa droga.

Em relação à reconsolidação, a microinfusão de *nor*-BNI imediatamente após a reativação não teve efeito sobre a expressão de congelamento no protocolo de CAC moderado. Por outro lado, no protocolo de CAC forte, a microinfusão de *nor*-BNI imediatamente após a reativação, mas não 6 h após, induziu generalização do congelamento, indicando que os HD κ ORs modulam negativamente a reconsolidação de memórias mais intensas e generalizadas. Além disso, a microinfusão intra-HD de GR 89696 imediatamente após a reativação da memória, mas

não 6 h após, reduziu a expressão de congelamento no contexto pareado (protocolo de CAC forte). Adicionalmente, a resposta condicionada de congelamento não foi reinstalada após um estímulo de choque lembrete, indicando que a ativação dos HD κ_2 ORs teve, de fato, um efeito inibitório sobre a reconsolidação da memória aversiva forte. O pré-tratamento com uma dose subefetiva de *nor*-BNI preveniu os efeitos do agonista dos κ_2 ORs. Finalmente, a microinfusão de *nor*-BNI ou de GR 89696 não teve efeito sobre o tempo de autolimpeza no teste de borrifagem com sacarose, sugerindo que essas drogas não alteraram o estado motivacional dos animais.

A microinfusão intra-HD de *nor*-BNI, um antagonista seletivo de κ ORs (TAKEMORI *et al.*, 1988), imediatamente após um CAC moderado, mas não 6 h após, foi capaz de aumentar o tempo de congelamento no contexto pareado, sugerindo o envolvimento dos κ ORs na consolidação da memória em ratos. A literatura tem mostrado resultados contraditórios provenientes de estudos *in vitro* e *in vivo* acerca da participação dos κ ORs nos processos de aprendizado e memória em ratos. Em fatias de hipocampo de rato, o bloqueio dos κ ORs não foi capaz de afetar a LTP (BRAMHAM, SARVEY, 1996). Além disso, a ativação desses receptores não apresenta efeito sobre os potenciais excitatórios pós-sinápticos, dependendo da linhagem dos ratos testadas (SALIN *et al.*, 1995), embora seja capaz de reduzir a liberação de glutamato em sinaptossomas (CONNER-KERR *et al.*, 1993). Por outro lado, nos estudos comportamentais *in vivo*, a ativação dos HD κ ORs prejudicou o aprendizado em ratos na tarefa do labirinto aquático de Morris (SANDIN *et al.*, 1998). Maiores níveis de dinorfina, o principal ligante endógeno dos κ ORs, também foram observados no hipocampo de ratos após experiências aversivas variadas (SHIRAYAMA *et al.*, 2004). Nesse contexto, podemos sugerir que o componente emocional relacionado a uma memória é determinante para o envolvimento dos HD κ ORs. Mostramos ainda que a *nor*-BNI não teve efeito sobre a memória quando os animais tiveram somente a experiência do contexto (grupo exposto ao contexto A sem choque) ou do choque (grupo que recebeu choque imediatamente após ser colocado no contexto A). Esses resultados indicam que a *nor*-BNI *per se* não é capaz de promover condicionamento contextual ou afetar alguma resposta de sensibilização que possa ter sido induzida pela experiência de

choque. Em conjunto, nossos dados sugerem que a ativação dos HDκORs promove um efeito inibitório sobre a consolidação da memória aversiva contextual em ratos. Essa sugestão também é suportada por estudos *in vivo* conduzidos em camundongos utilizando esse mesmo paradigma experimental (DAUMAS *et al.*, 2007).

A inibição prolongada dos κORs pela *nor*-BNI é bem conhecida na literatura, mas os mecanismos envolvidos nesse fenômeno permanecem pouco compreendidos. Duas vias de inibição foram propostas, uma direta e a outra indireta. A via direta está relacionada com a ação da *nor*-BNI sobre a atividade da cinase *c-Jun N-terminal 1*, o que resulta na inativação prolongada da sinalização mediada pelos κORs. Por outro lado, como via indireta, tem sido sugerido que a *nor*-BNI é metabolizada *in vivo* em metabólitos de longa duração, os quais podem se ligar covalentemente aos κORs (BRUCHAS *et al.*, 2007). Essa inibição prolongada dos κORs pela *nor*-BNI também tem sido relatada em estudos *in vivo* conduzidos em ratos e outras espécies animais, podendo persistir por até 3 semanas (HORAN *et al.*, 1992; JONES, HOLTZMAN, 1992; BRUCHAS *et al.*, 2007). Demonstramos aqui que a microinfusão de *nor*-BNI 6 h após a sessão de condicionamento não produziu qualquer efeito em uma sessão de teste subsequente (Teste A). Este resultado sugere que a ação dessa droga não interferiu de forma significativa na expressão da memória. Adicionalmente, demonstramos que o tempo de congelamento dos animais tratados com a *nor*-BNI permaneceu aumentado por, pelo menos, 28 dias no protocolo de CAC moderado, um período em que supostamente o animal estaria livre das ações dessa droga (HORAN *et al.*, 1992; JONES, HOLTZMAN, 1992; BRUCHAS *et al.*, 2007). Esse dado sugere que as ações da *nor*-BNI foram limitadas à consolidação da memória aversiva contextual, embora o mecanismo pelo qual o bloqueio dos κORs possa conduzir à potencialização da consolidação da memória ainda não esteja claro.

Mecanicisticamente, os κORs poderiam modular negativamente a consolidação da memória, prejudicando a sinalização glutamatérgica, um efeito oposto do esperado pela ativação dos receptores μ e/ou δ opioides (COHEN *et al.*, 1992; CAPOGNA *et al.*, 1993; REKLING, 1993; SVOBODA, LUPICA *et al.*, 1998). Por exemplo, estudos conduzidos no hipocampo de

ratos relataram que a ativação dos κ ORs foi capaz de reduzir a liberação de glutamato em sinaptossomas (CONNER-KERR *et al.*, 1993), além de reduzir os potenciais pós-sinápticos excitatórios nas fatias de hipocampo de algumas linhagens de ratos (SALIN *et al.*, 1995). Por outro lado a ativação dos receptores μ ou δ opioides aumenta a atividade dessa estrutura cerebral (COHEN *et al.*, 1992; CAPOGNA *et al.*, 1993; REKLING, 1993; SVOBODA, LUPICA *et al.*, 1998). Esses efeitos inibitórios dos κ ORs provenientes de estudos *in vitro* são atribuídos à participação desses receptores na supressão da exocitose do glutamato (WAGNER *et al.*, 1991, 1992), cuja participação é fundamental para as alterações plásticas envolvidas na formação e manutenção de memórias (LEE *et al.*, 2004).

Nesse sentido, mostramos que a microinfusão de *nor*-BNI imediatamente após um CAC moderado produziu efeitos duradouros sobre a memória (7 e 28 dias), indicando a participação de mecanismos de plasticidade neuronal nesse processo. De fato, a consolidação da memória contextual envolve alterações prolongadas de plasticidade neuronal no HD e requer, entre outros mediadores, o BDNF (LEE *et al.*, 2004; ALONSO *et al.*, 2005; LUBIN *et al.*, 2008). Um estudo conduzido em cultura de neurônios hipocampais primários demonstrou que a estimulação de κ ORs diminuiu a expressão do BDNF, um efeito prevenido pelo pré-tratamento com *nor*-BNI (DOGRA *et al.*, 2016). Em outro estudo, a microinfusão i.c.v. de *nor*-BNI *per se* induziu um aumento dos níveis de RNAm do BDNF no hipocampo de ratos por até 24 h (ZHANG *et al.*, 2007). No presente trabalho, demonstramos que a microinfusão de *nor*-BNI foi capaz de aumentar os níveis de BDNF no HD em um período que corresponde à consolidação da memória. Como exatamente o *nor*-BNI aumenta os níveis de BDNF hipocampais ainda não está claro, mas a habilidade do glutamato de regular a expressão do BDNF é bem descrita (ZAFRA *et al.*, 1990; ZAFRA *et al.*, 1991). Com base no exposto acima, sugerimos que o antagonismo dos κ ORs pela *nor*-BNI potencializa a consolidação da memória aversiva contextual por potencializar a neuroplasticidade hipocampal que suporta essa memória através da desinibição da liberação de glutamato.

Em seguida, hipotetizamos que os HD κ ORs poderiam ser recrutados especificamente durante a consolidação de uma memória aversiva contextual. De fato, demonstramos um

aumento significativo na imunomarcação dos HDkORs 1 h e 3 h após um CAC moderado. Esse aumento rápido na imunomarcação dos HDkORs (observado já a partir de 1 h após o CAC) poderia ser explicado por uma combinação de mudanças pós-transducionais com a subsequente translocação do receptor do citoplasma para a membrana, uma vez que esses processos podem ocorrer rapidamente (BABILON *et al.*, 2013). Ainda, esse efeito sobre a imunomarcação dos HDkORs foi observado apenas no grupo que teve a experiência associativa (choque-contexto). A este respeito, tem sido demonstrado na literatura que, para haver a formação de uma representação contextual com conteúdo emocional, se faz necessário a interação entre hipocampo dorsal e a ABL (RICHTER-LEVIN, AKIRAV, 2003; SPARTA *et al.*, 2014). Além disso, a ativação da ABL é capaz de potencializar a consolidação da memória aversiva contextual através da potencialização da neuroplasticidade hipocampal (McINTYRE *et al.*, 2005; HUFF *et al.*, 2006). Nesse sentido, qualquer mecanismo regulador que supostamente previna a formação de uma memória aversiva mais robusta do que o necessário (do inglês, *overconsolidation*) poderia ser particularmente promissor. Propomos então que os HDkORs poderiam ser precisamente e rapidamente recrutados para modular negativamente as informações provenientes da ABL durante a consolidação das memórias aversivas mais intensas. Por fim, o fato da imunomarcação dos HDkORs permanecer aumentada por pelo menos 3 h após o CAC moderado pode sugerir um aumento da expressão desses receptores também em locais mais distantes da sinapse (sítios extra-sinápticos), tal como sugerido para outros receptores (KNEUSSEL, HAUSRAT 2016). Esse mecanismo poderia ser particularmente importante para evitar efeitos deletérios de uma possível experiência aversiva subsequente, possibilitando o fornecimento rápido de HDkORs de "reserva" para locais sinápticos. No entanto, essa possibilidade ainda precisa ser investigada.

Uma vez que relatamos aqui um aumento substancial na imunomarcação dos HDkORs durante a consolidação de uma memória de intensidade moderada, foi hipotetizado que esses receptores também poderiam influenciar a consolidação de uma memória aversiva mais intensa. De fato, o antagonismo dos HDkORs, imediatamente após o CAC forte, mas não 6 h após, induziu a expressão generalizada de congelamento. A

generalização comportamental a partir de experiências prévias constitui, na maioria das vezes, um fenômeno biologicamente vantajoso, pois permite aos indivíduos exibirem comportamentos adequados em situações futuras semelhantes (DUNSMOOR, PAZ, 2015; HUCKLEBERRY *et al.*, 2016). Nesse sentido, sabe-se que o equilíbrio entre respostas específicas e generalizadas pode ser influenciado pela intensidade da experiência. Corroborando esta hipótese, Ghosh e Chattarji (2015) mostraram que o aumento da intensidade de condicionamento aversivo aumentou a probabilidade de roedores expressarem respostas generalizadas de congelamento às pistas novas (não condicionadas).

No presente estudo, a *nor*-BNI induziu generalização do congelamento somente no protocolo de CAC forte. Uma possível explicação para esse resultado está relacionada ao maior recrutamento de “neurônios generalizadores”, tal como previamente sugerido por Ghosh e Chattarji (2015). Esta sugestão poderia ser sustentada pela capacidade da *nor*-BNI de facilitar a neuroplasticidade hipocampal (WEISSKOPF *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 2007). Outra possível explicação refere-se à possibilidade da resposta condicionada ter alcançado um nível assintótico ou “teto”. De fato, mostramos que tanto os animais tratados com *nor*-BNI, quanto os tratados com veículo, expressaram níveis elevados e semelhantes de congelamento durante os Testes A1 e A2. Gazarini e colaboradores (2014) demonstraram que animais condicionados com 3 ou 5 choques expressaram quantidade comparável de congelamento na sessão de teste subsequente, indicando um “teto” da resposta condicionada. Um perfil semelhante também foi relatado por Baldi e colaboradores (2004) a partir do uso de diferentes intensidades de choque. Nessas condições, a potencialização adicional da memória aversiva tem sido associada à expressão generalizada da resposta condicionada (KAOUANE *et al.*, 2012). Por fim, embora um possível efeito “teto” no nível de congelamento tenha sido alcançado, no presente estudo sugerimos que a ocorrência da generalização envolve a facilitação dos processos de plasticidade subjacentes à consolidação da memória pela *nor*-BNI. Em suma, propõe-se aqui que a ativação dos HDKORs seria um dos mecanismos de modulação negativa necessários para atenuar a formação de uma memória com características mais generalizadas.

Uma vez que os HDkORs desempenharam um papel inibitório durante a consolidação da memória no protocolo de CAC moderado ou forte, decidimos investigar se esses receptores também participariam da modulação de uma experiência associativa mais fraca (CAC fraco). Nessa condição, o antagonismo de HDkORs imediatamente após um CAC fraco não teve efeito sobre o tempo de congelamento nos testes A e B. Cabe ressaltar que o protocolo de condicionamento fraco utilizado aqui foi suficientemente capaz de produzir ao menos um traço de memória, visto que a administração sistêmica de ioimbina, uma droga que aumenta a atividade noradrenérgica do cérebro por meio do antagonismo dos receptores α_2 -adrenérgicos pré-sinápticos, aumentou o tempo de congelamento no Teste A. Em relação à ausência de efeito da *nor*-BNI relatada aqui, pode ser argumentado que, ao contrário dos neurotransmissores clássicos (por exemplo, noradrenalina e glutamato) que são facilmente liberados mesmo após uma estimulação neuronal de baixa frequência (ROESLER *et al.*, 2005), os opioides endógenos como a dinorfina são liberados somente após altas frequências de estimulação neuronal (LUNDBERG, HOKFELT, 1983; IVERFELDT *et al.*, 1989; DRAKE *et al.*, 1994). Esse evento foi relacionado com o efeito inibitório mediado pela ativação dos kORs sobre a liberação de glutamato (WAGNER *et al.*, 1992). Assim, é possível que a consolidação de uma memória aversiva fraca não cumpra os requisitos necessários para uma liberação substancial dos ligantes que atuam nos kORs hipocâmpais, indicando que esses receptores seriam requeridos somente em resposta a experiências emocionais mais intensas.

Corroborando nossa sugestão, foi demonstrado que a microinfusão de capsazepina, um antagonista de receptores de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1; do inglês *transient receptor potential vanilloid 1*), após a sessão de CAC forte foi capaz de prejudicar a consolidação da memória. Contudo, o mesmo efeito não foi visualizado após um CAC fraco (GENRO, 2012). De maneira similar, o sistema endocanabinóide parece ser especificamente recrutado no hipocampo para modular memórias aversivas mais intensas (DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2010). Portanto, sugerimos que o efeito inibitório mediado pelos HDkORs seria substancialmente requerido para modular a consolidação de memórias aversivas

moderadas a intensas, uma vez que uma participação mais “discreta” desses receptores nas memórias aversivas fracas não pode ser totalmente descartada (tal como, para contrabalancear a atividade excitatória de outros sistemas de neurotransmissão).

Até agora, os resultados aqui apresentados indicam que a modulação negativa dos HD κ ORs sobre a consolidação está estritamente relacionada com a intensidade do protocolo de CAC. Entretanto, esses resultados não esclarecem quais os tipos de HD κ ORs estariam envolvidos nesse processo. Assim, o nosso próximo passo foi investigar o envolvimento dos diferentes tipos de κ ORs (κ_1 ORs e κ_2 ORs) na consolidação da memória após o CAC forte. Os dados obtidos demonstraram que a microinfusão do agonista seletivo de κ_2 ORs, o GR 89696 (BUTELMAN *et al.*, 2001), mas não do agonista seletivo de κ_1 ORs (U-69593; ZUKIN *et al.*, 1988), prejudicou a consolidação da memória, sugerindo que os HD κ_2 ORs desempenham um papel crítico nesse processo. É importante ressaltar que a microinfusão de uma dose subefetiva de *nor*-BNI impediu esse efeito. Contrastando nossos achados, Daumas e colaboradores (2007) relataram os efeitos inibitórios de um agonista de κ_1 ORs, o U-50,488, sobre a consolidação da memória aversiva em camundongos. Uma possível explicação para esses achados contraditórios pode estar relacionada com a variada distribuição dos κ ORs ao longo do hipocampo entre as diferentes espécies de roedores. Por exemplo, Gackenheim e colaboradores (2005) detectaram os κ ORs apenas na região CA3 do hipocampo de camundongos, enquanto que em ratos foi encontrada uma alta densidade de κ ORs nas regiões CA2/CA3 (McLEAN *et al.*, 1987) e CA1 (RÁCZ, HALASY, 2003) do hipocampo.

Diferenças em relação à expressão dos tipos de κ ORs também devem ser consideradas. Por exemplo, maiores níveis basais de κ_1 ORs em relação aos κ_2 ORs foram encontrados no hipocampo de cobaia (ZUKIN *et al.*, 1988), enquanto que no hipocampo de ratos os κ_2 ORs são altamente expressos (ZUKIN *et al.*, 1988; UNTERWALD *et al.*, 1991). No entanto, mesmo sendo menos expressos, κ_1 ORs adicionais poderiam ser recrutados durante a consolidação de uma memória aversiva, uma vez que, mostramos que a experiência de CAC induziu aumento na imunomarcagem dos HD κ ORs. Porém, a falta de efeito do agonista seletivo dos κ_1 OR, o U-69593, sugere que esse não foi o caso no presente trabalho.

Por fim, menores níveis de BDNF foram encontrados no HD 90 min após a microinfusão de GR 89696, sugerindo uma possível via pela qual a ativação dos κ ORs prejudicou a consolidação da memória aversiva contextual. Portanto, os resultados aqui obtidos indicam que, em ratos, a modulação negativa da consolidação da memória após o CAC forte é mediada pela ativação dos HD κ_2 ORs, mas não pela ativação dos HD κ_1 ORs.

O presente estudo forneceu evidências de que os HD κ_2 ORs exercem um papel inibitório sobre a consolidação da memória em ratos. Entretanto, o mecanismo subjacente à ativação desses receptores permanece incerto. Nesse sentido, pelo menos dois mecanismos têm sido propostos a partir de estudos conduzidos em hipocampo de cobaias. O primeiro deles sugere que a ativação dos HD κ_2 ORs inibe a atividade excitatória mediada pelos receptores NMDA, através de uma interação com vias de sinalização intracelulares. Esse mecanismo foi proposto a partir da observação de que a ativação dos HD κ_2 ORs foi capaz de inibir correntes elétricas mediadas pelo receptor NMDA, mesmo considerando a distância física que há entre esses receptores ao longo do neurônio (GAUDLE *et al.*, 1994). É importante ressaltar que esse mesmo mecanismo não foi compartilhado pelos κ_1 ORs. O outro possível mecanismo sugere a supressão da liberação de glutamato mediada pela ativação dos HD κ ORs, a qual poderia diminuir a excitabilidade (WAGNER *et al.*, 1992; CONNER-KERR *et al.*, 1993; SIMMONS, CHAVKIN, 1996) e a subsequente neuroplasticidade hipocampal. Vale ressaltar que esse último mecanismo é genérico para os κ ORs, não havendo ainda uma distinção entre os seus dois tipos de receptores (κ_1 ORs e κ_2 ORs). Por fim, ambos os mecanismos relatados acima podem contribuir para justificar os efeitos encontrados com a microinfusão de GR 89696 na consolidação da memória, embora mais estudos ainda sejam necessários para elucidar completamente tais mecanismos.

A administração de *nor*-BNI imediatamente após a sessão de reativação, mas não 6 h após, induziu a expressão generalizada do comportamento de congelamento no protocolo de CAC forte. Esses resultados indicam que a ação dessa droga foi restrita à janela de reconsolidação da memória. Adicionalmente, a microinfusão de *nor*-BNI não produziu nenhum efeito sobre a reconsolidação da memória no protocolo de CAC

moderado. Essa ausência de efeito da *nor*-BNI encontrada apenas no protocolo de CAC de menor intensidade não é surpreendente, pois, tal como discutido anteriormente para a etapa de consolidação, os peptídeos opioides requerem altas frequências de estimulação neuronal para serem liberados (LUNDBERG, HOKFELT, 1983; IVERFELDT *et al.*, 1989; DRAKE *et al.*, 1994) e assim promover seus efeitos inibitórios sobre a liberação de glutamato (WAGNER *et al.*, 1992). Por outro lado, os neurotransmissores clássicos são facilmente liberados mesmo após uma estimulação neuronal de baixa frequência (ROESLER *et al.*, 2005). Corroborando essa sugestão, manipulações farmacológicas de sistemas clássicos de neurotransmissão capazes de induzir generalização em um protocolo de reconsolidação com CAC forte, também se mostram efetivas em aumentar os níveis de congelamento no contexto pareado no protocolo de CAC moderado (GAZARINI *et al.*, 2013; VANVOSSSEN *et al.*, 2013). Assim, propomos que a intensidade da experiência também é determinante para o recrutamento do sistema dinorfinérgico durante a reconsolidação da memória. Esta sugestão é apoiada por estudos que relataram que esse sistema é substancialmente requerido em situações que envolvem alto grau de aversividade (SHIRAYAMA *et al.*, 2004; OGREN *et al.*, 2010).

Em um primeiro momento, os resultados discutidos acima parecem divergir dos achados da literatura em que protocolos de CAC mais fortes e mais fracos se correlacionam com uma menor ou maior suscetibilidade a interferentes farmacológicos após a reativação, respectivamente (SUZUKI *et al.*, 2004; KWAK *et al.*, 2012). No entanto, vale ressaltar que grande parte desses achados da literatura foram encontrados especificamente em condições experimentais que limitavam a indução de um estado reconsolidação (as chamadas “condições limitantes”). Por outro lado, ambos os protocolos utilizados aqui, o CAC forte e o CAC moderado, são capazes de induzir a reconsolidação da memória (GAZARINI *et al.*, 2013; VANVOSSSEN *et al.*, 2013), indicando que essa memória estava lábil e, portanto, suscetível a interferentes no momento que a *nor*-BNI foi administrada. Sendo assim, como ambos os resultados foram obtidos através do uso de uma droga antagonista de κ ORs, se a ação dessa droga seria ou não traduzida em uma alteração comportamental dependeria do grau de envolvimento do sistema dinorfinérgico naquela etapa

da memória, o que ocorreu somente quando utilizamos o protocolo de reconsolidação com um CAC forte. Dessa forma, sugerimos que os HDkORs prejudicam especificamente a reconsolidação de memórias mais intensas e generalizadas.

No presente trabalho, a mesma intensidade de CAC suficiente para produzir uma memória sensível às ações da *nor*-BNI no protocolo de consolidação, produziu uma memória insensível às ações dessa mesma droga no protocolo de reconsolidação (*nor*-BNI após um CAC moderado vs *nor*-BNI após a reativação de um CAC moderado). Essa diferença encontrada é suportada por dados prévios da literatura que demonstram a dissociação de mecanismos plásticos e bioquímicos envolvidos na consolidação e reconsolidação da memória (SCHAFFÉ *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2004, 2008). Por exemplo, Schafe e colaboradores (2005) demonstraram que a microinfusão intra-amígdala de 7-nitroindazol, um inibidor seletivo da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase, ou de c-PTIO, um sequestrador de óxido nítrico impermeável à membrana, prejudicou a consolidação, mas não a reconsolidação, utilizando o mesmo protocolo de condicionamento ao som em ratos. Ainda, Lee e colaboradores (2004, 2008) demonstraram que no HD ocorre uma dupla dissociação entre o gene de expressão imediata *Zif268* e o BDNF durante a reconsolidação e consolidação, respectivamente. Essas diferenças encontradas entre a consolidação e a reconsolidação devem ser consideradas aqui, uma vez que, por exemplo, já foi mostrado que o BDNF é capaz de suprarregular a expressão de um precursor da dinorfina, a prodinorfina, pelo menos em neurônios estriatais (LOGRIP *et al.*, 2008). Portanto, além da intensidade da experiência de CAC ser crucial para o recrutamento dos HDkORs, mecanismos específicos inerentes à consolidação e à reconsolidação da memória também devem ser considerados e melhor caracterizados no futuro.

Posteriormente, demonstramos que a ativação dos HDk₂ORs imediatamente após a sessão de reativação, mas não 6 h após, reduziu a expressão de congelamento no contexto pareado, sugerindo que a reconsolidação da memória no protocolo de CAC forte foi prejudicada. Contudo, tem sido demonstrado que a sessão de reexposição (evocação/reativação) é capaz de desencadear tanto a

reconsolidação quanto a extinção da memória (SUZUKI *et al.*, 2004; MERLO *et al.*, 2014; ALFEI *et al.*, 2015). Do ponto de vista comportamental, tanto o prejuízo de reconsolidação quanto a extinção da memória, resultam na redução da expressão do congelamento. Assim, uma interpretação alternativa para o resultado aqui relatado poderia ser de que o GR 89696 facilitou a extinção da memória. No entanto, uma característica marcante da extinção no protocolo de CAC é o retorno da resposta condicionada de congelamento após um choque lembrete (BOUTON, BOLLES, 1979; WESTBROOK, 2002), o que não ocorre caso a reconsolidação da memória tenha sido prejudicada (DUVARCI, NADER, 2004; BUSTOS *et al.*, 2006; FRANZEN *et al.*, 2018). No presente estudo, mostramos que não houve o retorno dos níveis de congelamento no grupo tratado com GR 89696 após a sessão de reinstalação. Esse padrão de resposta indica que o GR 89696 é capaz de prejudicar a reconsolidação da memória, assim como outras drogas relatadas na literatura, tais como os inibidores de síntese proteica (DUVARCI, NADER, 2004), os benzodiazepínicos (BUSTOS *et al.*, 2009) e o canabidiol (STERN *et al.*, 2012).

Outra condição capaz de promover a redução do congelamento após a sessão de reativação é o “contra-condicionamento”, o qual consiste no pareamento de um EC já provido de uma valência emocional (no nosso caso, negativa) com um EI novo e de valência oposta (p. ex: o efeito recompensador de uma droga) (PAVLOV, 1927). Como resultado, essa segunda experiência associativa suprime a expressão comportamental inerente à primeira associação (BOUTON, 2003). De fato, as propriedades recompensadoras de drogas ou de informações apetitivas apresentadas durante ou logo após a sessão de reativação podem alterar a valência emocional dessa memória (HAUBRICH *et al.*, 2014; FERRER MONTI *et al.*, 2016; PEDRAZA *et al.*, 2018).

Nesse contexto, tem sido demonstrado que os κ ORs estão amplamente expressos em áreas do sistema límbico, tais como o núcleo *accumbens*, a amígdala e o hipocampo (KNOLL, CARLEZON, 2011). Por conta disso, esses receptores podem modular circuitos motivacionais e de recompensa, bem como modular as memórias. Por exemplo, a ativação dos HD κ ORs promove efeitos pró-depressivos no paradigma de desamparo aprendido em ratos, enquanto que o seu bloqueio produz um

efeito oposto (SHIRAYAMA *et al.*, 2004). Além disso, foi demonstrado que a administração i.p. de um agonista de κ ORs, o U-50,488H, promoveu aversão condicionada por lugar, além de impedir o efeito de preferência condicionada por lugar induzida por cocaína (SUZUKI *et al.*, 1992). Em paralelo, a ativação desses receptores também produziu déficit de aprendizado no protocolo de CAC em camundongos (DAUMAS *et al.*, 2007). No presente trabalho, a microinfusão intra-HD de *nor*-BNI ou de GR 89696 não alterou o tempo de autolimpeza no teste de borrifagem com sacarose, sugerindo que o tratamento com essas drogas não produziu alterações no estado motivacional desses animais. Esses dados suportam a nossa hipótese inicial de que o traço da memória original foi modificado por essas drogas via reconsolidação (atualização da memória), sem a interferência de alterações no estado interno do animal. Essa sugestão também é suportada por estudos que demonstraram que o contra-condicionamento não induz o apagamento ou a modificação permanente da memória aversiva original (BOUTON, 2002), podendo esta retornar, por exemplo, após uma sessão de reinstalação (BROOKS *et al.*, 1995; BOUTON *et al.*, 2012), fato que não ocorreu com o grupo tratado com GR 89696 após o protocolo de reinstalação no presente estudo.

Em nosso estudo fornecemos evidências de que a ativação dos HD κ_2 ORs desempenha um efeito inibitório sobre a reconsolidação da memória em ratos. Embora o mecanismo subjacente à ativação desses receptores ainda não esteja elucidado, alguns possíveis mecanismos, os quais poderiam ser comuns com a etapa consolidação da memória, já foram discutidos anteriormente. Sendo assim, vamos nos limitar aqui a discutir as implicações desse resultado do ponto de vista adaptativo.

Tem sido aceito na literatura que a etapa de reconsolidação permite que uma memória já existente e, portanto, consolidada, seja modificada (SARA, 2000; DUDAI, 2006). De acordo a nossa hipótese, a ativação dos HD κ_2 ORs durante essa etapa representa um importante mecanismo inibitório no sentido de impedir que a memória seja formada de maneira mais intensa e generalizada que o necessário. Esse resultado é interessante uma vez que a reconsolidação pode acontecer sucessivamente e indefinidamente a cada vez que a memória for desestabilizada (DUDAI, 2012). Dessa forma, é

possível que o papel regulatório dos HDK₂ORs possa acompanhar essa etapa altamente dinâmica das memórias, contribuindo para a recalibração da mesma a cada vez que a memória for desestabilizada, pelo menos enquanto essa memória permanecer aversiva o suficiente (essa hipótese precisaria ainda ser testada).

Vale ressaltar, no entanto, que o processo de reconsolidação só ocorre após a desestabilização de uma memória (NADER *et al.*, 2000), a qual, por sua vez, parece não ocorrer, ou ocorre de maneira muito limitada, em memórias mais remotas ou de intensidade muito elevada (BUSTOS *et al.*, 2009; BUSTOS *et al.*, 2010). Sendo assim, a participação dos HDK₂ORs torna-se restrita àquelas memórias aversivas mais intensas, porém que ainda preservem a capacidade de desestabilização. Uma exceção seria se a ativação dos próprios HDK₂ORs também pudesse desencadear o processo de desestabilização da memória, um efeito proposto, por exemplo, para a ação da D-cicloserina em receptores NMDA para glutamato (BUSTOS *et al.*, 2010, GAZARINI *et al.*, 2014). No entanto, essa possibilidade ainda precisa ser investigada. De fato, tão importante quanto ter agentes capazes de modular a etapa de reconsolidação de uma memória é ter agentes capazes de induzir a labilização dessa memória (BUSTOS *et al.*, 2010). Do ponto de vista clínico, por exemplo, a ausência de desestabilização de memórias traumáticas tem sido associada à ação limitada de alguns fármacos que atuariam induzindo prejuízo de reconsolidação da memória (GAMACHE *et al.*, 2012).

Por fim, vale ressaltar que a maioria dos trabalhos que tem surgido na literatura acerca dos κORs, estão direcionados para o campo de pesquisa da dor. No entanto, as pesquisas nessa área têm incentivado novas descobertas acerca dos mecanismos subjacentes à ativação desses receptores, permitindo, por exemplo, a síntese de novos ligantes dos κORs, tais como, os agonistas tendenciosos (do inglês, *biased agonist*) triazol 1.1 e a 6'-guanidinonaltrindol (6'-GNTI). Esses compostos são capazes, por exemplo, de promover analgesia sem determinar efeitos disfóricos ou sedativos (efeitos que limitaram o uso de agonistas dos κORs na clínica) (RIVES *et al.*, 2012; EHRICH *et al.*, 2015; BRUST *et al.*, 2016). Além disso, a 6'-GNTI tem demonstrado ser um agonista seletivo dos κ₂ORs. Em resumo, embora as pesquisas que envolvem os κORs sejam mais densas no campo

de pesquisa da dor, essas vêm fornecendo, mesmo que indiretamente, ferramentas farmacológicas valiosas, as quais seguem “abrindo portas” para as pesquisas que buscam esclarecer o papel dos κ ORs em vários outros processos fisiológicos, incluindo o campo de estudo das memórias.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

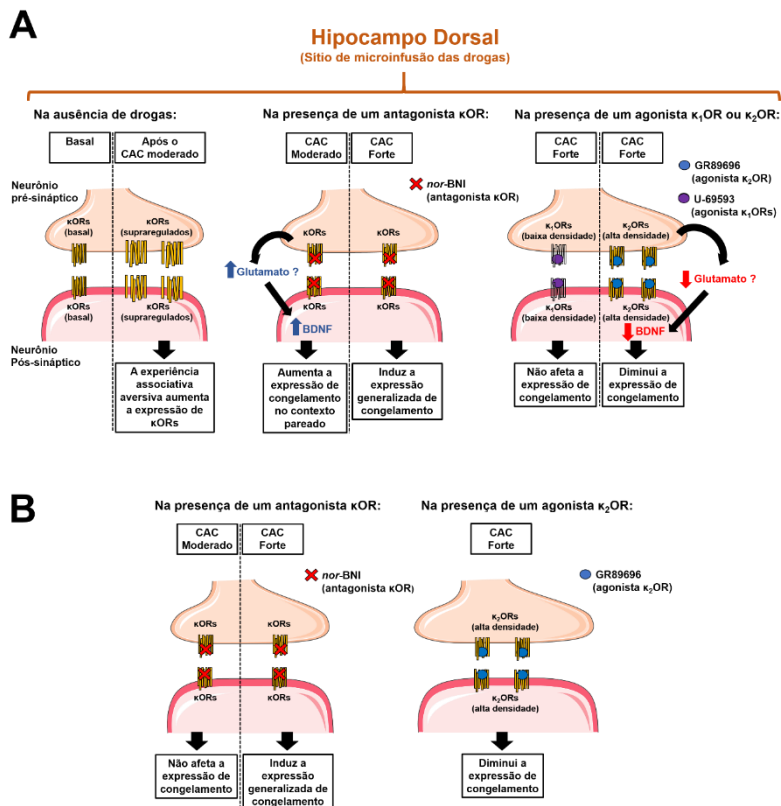
Em resumo, é proposto aqui que a ativação dos receptores κ opioides, presentes no hipocampo dorsal de ratos, é importante para a modulação negativa da consolidação e reconsolidação de memórias aversivas contextuais mais intensas e generalizadas. Nesse contexto, a intensidade da experiência aversiva é crítica para determinar o recrutamento dos HD κ ORs.

Esse estudo também fornece evidências sobre o papel inibitório dos HD κ_2 ORs na consolidação e reconsolidação da memória, embora os mecanismos subjacentes à ativação desses receptores ainda não estejam claros.

Portanto, os presentes achados sugerem o envolvimento dos HD κ ORs na consolidação e reconsolidação da memória aversiva contextual e a potencial utilidade dos agonistas de κ_2 ORs para modular negativamente as memórias aversivas mais intensas e generalizadas.

A **Figura 29** resume e ilustra os principais achados desse trabalho.

Figura 29. Representação esquemática dos principais achados deste trabalho.



A figura ilustra o papel proposto para os κ ORs localizados no hipocampo dorsal de ratos na (A) consolidação e (B) reconsolidação da memória em diferentes protocolos de condicionamento aversivo contextual (CAC), a partir da utilização ou não de drogas. BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; κ ORs, receptor κ opioide; κ_1 ORs, receptor κ_1 opioide; κ_2 ORs, receptor κ_2 opioide.

Limitações do estudo

(1) Ausência de anticorpos seletivos contra os κ_2 ORs ou, pelo menos, de anticorpos contra os δ ORs para realizar uma coimunoprecipitação.

(2) Limitações encontradas durante a realização da técnica de *Western blotting* impediram a análise dos seguintes experimentos:

- Curva temporal da imunomarcação dos HD κ ORs de ratos eutanasiados 0, 1, 3 e 6 h após a sessão de CAC fraco;

- Curva temporal da imunomarcação dos HD κ ORs de ratos eutanasiados 0, 1, 3 e 6 h após a sessão de reativação da memória de um CAC moderado e forte;

- Imunomarcação dos HD κ ORs de animais considerados “bons generalizadores” e “maus generalizadores”. Basicamente, após um protocolo de CAC mais intenso, com 5 choques de 1,0 mA, os animais foram testados no contexto B e divididos em dois grupos: animais que apresentavam elevado tempo de congelamento (“bons generalizadores”) e animais que apresentavam baixo tempo de congelamento (“maus generalizadores”).

REFERÊNCIAS

- Alberini, C.M. 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? **Trends Neurosci.** 28(1):51-56.
- Alberini, C.M. 2011. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. **Front Behav Neurosci.** 5:12.
- Alfei, J.M., Ferrer Monti, R.I., Molina, V.A., Bueno, A.M., Urcelay, G.P. 2015. Prediction error and trace dominance determine the fate of fear memories after post-training manipulations. **Learn Mem.** 22(8):385-400.
- Alonso, M., Bekinschtein, P., Cammarota, M., Vianna, M.R., Izquierdo, I., Medina, J.H. 2005. Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. **Learn Mem.** 12:504–510.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J. 2007. **The Hippocampus Book.** Oxford: Oxford University Press.
- Anokhin, K.V., Tiunova, A.A., Rose, S.P. 2002. Reminder effects-reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks. **Eur J Neurosci.** 15:1759-1765.
- Appleyard, S.M., Celver, J., Pineda, V., Kooor, A., Wayman, G.A., Chavkin, C. 1999. Agonist dependent desensitization of the kappa opioid receptor by G protein receptor kinase and beta-arrestin. **J Biol Chem.** 274:23802-23807.
- Babilon, S., Mörl, K., Beck-Sickinger, A.G. 2013. Towards improved receptor targeting: anterograde transport, internalization and postendocytic trafficking of neuropeptide Y receptors. **Biol Chem.** 394(8): 921-936.
- Baldi, E., Lorenzini, C.A., Bucherelli, C. 2004. Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. **Neurobiol Learn Mem.** 81:162-166.

Bannerman, D.M., Sprengel, R., Sanderson, D.J., McHugh, S.B., Rawlins, J.N., Monyer, H., Seeburg, P.H. 2014. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. **Nat Rev Neurosci.** 15(3):181-92.

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Medina, J.H. 2014. BDNF and memory processing. **Neuropharmacol.** 76:677-683.

Blanchard, R.J, Blanchard, D.C. 1969. Crouching as an index of fear. **J Comp Physiol Psychol.** 67:370-375.

Bliss, T.V., Collingridge, G.L. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature.** 361:31-9.

Bliss, T.V., Lømo, T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J Physiol.** 232:331-356.

Borbély, E., Scheich, B., Helves, Z. 2013. Neuropeptides in learning and memory. **Neuropeptides.** 47:439-450.

Bouton, M.E., Bolles, R.C. 1979. Role of conditioned contextual stimuli in reinstatement of extinguished fear. **J Exp Psychol Anim Behav Process.** 5(4):368.

Bouton, M.E., Ricker, S.T. 1994. Renewal of extinguished responding in a second context. **Learn Behav.** 22(3): 317-324.

Bouton, M.E., Westbrook, R.F., Corcoran, K.A., Maren, S. 2006. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. **Biol Psych.** 60(4)352-360.

Bramham, C.R., Sarvey, J.M. 1996. Endogenous activation of mu and delta-1 opioid receptors is required for long-term potentiation induction in the lateral perforant path: dependence on GABAergic inhibition. **J Neurosci.** 15:8123-8131.

Bruchas, M.R., Chavkin, C. 2010. Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor. **Psychopharmacol.** 210:137-147.

Bruchas, M.R., Macey, T.A., Lowe, J.D., Chavkin, C. 2006. Kappa opioid receptor activation of $p38$ MAPK is GRK3- and arrestin-dependent in neurons and astrocytes. **J Biol Chem.** 281:18081–18089.

Bruchas, M.R., Yang, T., Schreiber, S., Defino, M., Kwan, S.C., Li, S., Chavkin, C. 2007. Long-acting κ opioid antagonists disrupt receptor signaling and produce noncompetitive effects by activating *c-Jun N-terminal kinase*. **J Biol Chem.** 282:29803-29811.

Brust, T.F., Morgenweck, J., Kim, S.A., Rose, J.H., Locke, J.L., Schmid, C.L., Zhou, L., Stahl, E.L., Cameron, M.D., Scarry, S.M., Aubé, J., Jones, S.R., Martin, T.J., Bohn, L. M. 2016. Biased agonists of the kappa opioid receptor suppress pain and itch without causing sedation or dysphoria. **Sci Signal.** 9(456):ra117.

Bustos, S.G., Giachero, M., Maldonado, H., Molina, V.A. 2010. Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-activation D-cycloserine administration. **Neuropsychopharmacol.** 35(5):1097-1108.

Bustos, S.G., Maldonado, H., Molina, V. A. 2006. Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. **Neuroscience.** 139(3):831-842.

Bustos, S.G., Maldonado, H., Molina, V.A. 2009. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. **Neuropsychopharmacol.** 34(2):446-457.

Butelman, E.R., Ko, M.C., Traynor, J.R., Vivian, J.A., Kreek, M.J., Woods, J.H. 2001. GR89,696: a potent κ -opioid agonist with subtype selectivity in rhesus monkeys. **J Pharmacol Exp Ther.** 298:1049-1059.

Cammarota, M., Bevilaqua, L.R., Medina, J.H., Izquierdo, I. 2004. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. **Learn Mem.** 11:572-578.

Capogna, M., Gähwiler, B.H, Thompson, S.M. 1993. Mechanism of mu-opioid receptor-mediated presynaptic inhibition in the rat hippocampus *in vitro*. **J Physiol.** 470:539-58.

Carlezon, W.A., Jr, Duman, R.S., Nestler, E.J. 2005. The many faces of CREB. **Trends Neurosci.** 28(8):436-45.

Carr, H.A., Watson, J.B. 1908. Orientation in the white rat. **J Comp Neurol Psychol.** 18:275-277.

Caudle, R.M., Chavkin, C., Dubner, R. 1994. Kappa 2 opioid receptors inhibit NMDA receptor-mediated synaptic currents in guinea pig CA3 pyramidal cells. **J Neurosci.** 14:5580-5589.

Cavalli, J., Bertoglio, L.J., Carobrez, A.P. 2009. Pentylene tetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. **Neurobiol Learn. Mem.** 92:512-518.

Cenquizca, L.A., Swanson, L.W. 2007. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. **Brain Research Reviews.** 56(1):1-26.

Chavkin, C. 2013. Dynorphin—still an extraordinarily potent opioid peptide. **Mol pharmacol.** 83:729–736.

Chavkin, C., James, I. F., Goldstein, A. 1982. Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. **Science.** 215:413–415.

Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J.A., Yu, L. 1993a. Molecular cloning and functional expression of a m-opioid receptor from rat brain. **Mol Pharmacol.** 44:8-12.

Chen, Y., Mestek, A., Lui, J., Yu, L. 1993b. Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. **Biochem J.** 295:625-628.

Cho, H.J., Basbaum, A.I. 1989. Ultrastructural analysis of dynorphin B-immunoreactive cells and terminals in the superficial

dorsal horn of the deafferented spinal cord of the rat. **J Comp Neurol.** 281:193–205.

Clark, J.A., Liu, L., Price, M., Hersh, B., Edelson, M., Pasternak, G.W. 1989. Kappa opiate receptor multiplicity: evidence for two U50,488-sensitive kappa 1 subtypes and a novel kappa 3 subtype. **J Pharmacol Exp Therapeut.** 251(2):461–468.

Cohen, G.A., Doze, V.A., Madison, D.V. 1992. Opioid inhibition of GABA release from presynaptic terminals of rat hippocampal interneurons. **Neuron.** 9(2):325-35.

Conner-Kerr, T.A., Simmons, D.R., Peterson, G.M., Terrian, D.M. 1993. Evidence for the corelease of dynorphin and glutamate from rat hippocampal mossy fiber terminals. **J Neurochem.** 61:627–636.

Cox, B.M., Opheim, K.E., Teschemacher, H., Goldstein, A. 1975. A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. 2. Purification and properties. **Life Sci.** 16:1777-1782

Dacher, M., Lagarrigue, A., Gauthier, M. 2005. Antennal tactile learning in the honeybee: effect of nicotinic antagonists on memory dynamics. **Neurosci.** 130:37-50.

Daumas, S., Betourne, A., Halley, H., Wolfer, D.P., Lipp, H.P., Lassalle, J.M., Frances, B. 2007. Transient activation of the CA3 Kappa opioid system in the dorsal hippocampus modulates complex memory processing in mice. **Neurobiol Learn Mem.** 88:94-103.

De Kloet, E.R., Wiegant, V.M., De Wied, D. 1987. **Neuropeptides and Brain function.** Progress in Brain Research. Vol. 72, Amsterdam, Elsevier.

De Oliveira Alvares, L., Crestani, A.P., Cassini, L.F., Haubrich, J., Santana, F., Quillfeldt, A. 2013. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. **Neurosci.** 244:42-48.

De Oliveira Alvares, L., Engelke, D.S., Diehl, F., Scheffer-Teixeira, R., Haubrich, J., De Freitas Cassini, L., Molina, V.A., Quillfeldt, J.A. 2010. Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory **Learn Mem.** 17:202-209.

Devietti, T.L., Kirkpatrick, B.R. 1976. The amnesia gradient: inadequate as evidence for a memory consolidation process. **Science.** 194(4263):438-440.

Dexter, W.R., Merrill, A.K. 1969. Role of contextual discrimination in fear conditioning. **J Comp Physiol Psychol.** 69(4):677-681.

Dierssen, M. 2012. Down syndrome: the brain in trisomic mode. **Nat Rev Neurosci.** 13(12):844-58.

Dogra, S., Kumar, A., Deepmala, U., Sahasrabudde, A.A., Yadav, N. 2016. Chronic Kappa opioid receptor activation modulates NR2B: Implication in treatment resistant depression. **Sci Rep.** 6:33401.

Drake, C.T., Terman, G.W., Simmons, M.L., Milner, T.A., Kunkel, D.D., Schwartzkroin, P.A., Chavkin, C. 1994. Dynorphin opioids present in dentate granule cells may function as retrograde inhibitory neurotransmitters. **J Neurosci.** 14:3736-3750.

Dua, A.K., Pinsky, C., LaBella, H.S. 1985. Peptidases that terminate the action of enkephalins. Consideration of physiological importance for amino-, carboxy-, endo-, and pseudoenkephalinase. **Life Sci.** 57:985-92.

Dudai, Y. 1989. **The neurobiology of memory: concepts, findings, trends.** Oxford University Press.

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

Dudai, Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annu Rev Psychol.** 55:51-86.

- Dudai, Y. 2006. Reconsolidation: the advantage of being refocused. **Curr Opin Neurobiol.** 16:174-178.
- Dudai, Y. 2012. The restless engram: consolidations never end. **Annu Rev Neurosci** 35:227-247.
- Dunsmoor, J.E., Murphy, G.L. 2015. Categories, concepts and conditioning: How humans generalize fear. **Trends Cogn Sci.** 19(2):73-77.
- Dunsmoor, J.E., Paz, R. 2015. Fear generalization and anxiety: behavioral and neural mechanisms. **Biol Psych.** 78(5):336-343.
- Duvarci, S., Nader, K. 2004. Characterization of fear memory reconsolidation. **J Neurosci.** 24(42):9269-9275.
- Ehrich, J.M., Messinger, D.I., Knakal, C.R., Kuhar, J.R., Schattauer, S.S., Bruchas, M.R., Zweifel, L.S., Kieffer, B.L., Phillips, P.E., Chavkin, C. 2015. Kappa opioid receptor-induced aversion requires *p38* MAPK activation in VTA dopamine neurons. **J Neurosci.** 35:12917-12931.
- Eisenberg, M., Kobil, T., Berman, D.E., Dudai, Y. 2003. Stability of retrieved memory: Inverse correlation with trace dominance. **Science.** 301:1102-1104.
- Do Espírito Santo, C.C., Secco, D.D., Meireles, A., De Freitas, G.R., Bobinski, F., Cunha, M.P., Rodrigues, A.L.S., Swarowsky, A., Santos, A.R.S., Ilha, J. 2018. Locomotor Treadmill Training Promotes Soleus Trophism by Mammalian Target of Rapamycin Pathway in Paraplegic Rats. **Neurochem Res.** 43(6):1258-1268.
- Exton-Mcguinness, M.T.J., Lee, J.L.C., Reichelt, A.C. 2015. Updating memories-the role of prediction errors in memory reconsolidation. **Behav Brain Res.** 278:375-384.
- Fairén, A. 2007. Cajal and Lorente de Nó on cortical interneurons: coincidences and progress. **Brain Res Rev.** 55:430-444.

- Fanselow, M.S. 1990. Factors governing one trial contextual conditioning. **Anim Learn Behav.** 18, 264–270.
- Fanselow, M.S. 2000. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behav Brain Res.** 110(1-2):73-81.
- Fanselow, M.S, Dong, H.W. 2010. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron.** 65(1):7-19.
- Ferrer Monti, R.I., Giachero, M., Alfei, J.M., Bueno, A.M., Cuadra, G., Molina, V.A. 2016. An appetitive experience after fear memory destabilization attenuates fear retention: involvement GluN2B-NMDA receptors in the basolateral amygdala complex. **Learn Mem.** 23:465-478
- Fischli, W., Goldstein, A., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E. 1982. Isolation and amino acid sequence analysis of a 4,000-dalton dynorphin from porcine pituitary. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 79:5435–5437.
- Forbes, T.W., Muenzinger, K.F., Wendt, G.R., Ruckmick, C.A. 1935. Report of round table on use of electric shock. **Psychol Bull.** 32(3):185-196.
- Forcato, C., Argibay, P.F., Pedreira, M.E., Maldonado, H. 2009. Human reconsolidation does not always occur when a memory is retrieved: the relevance of the reminder structure. **Neurobiol Learn Mem.** 91(1):50-57.
- Gackenhaimer, S.L., Suter, T.M., Pintar, J.E., Quimby, S.J., Wheeler, W.J., Mitch, C.H., Gehlert, D.R., Statnick, M.A. 2005. Localization of opioid receptor antagonist [3H]-LY255582 binding sites in mouse brain: comparison with the distribution of mu, delta and kappa binding sites. **Neuropeptides.** 39:559–567.
- Gall, C., Brecha, N., Karten, H.J., Chang, K.J. 1981. Localization of enkephalin-like immunoreactivity to identified axonal and neuronal populations of the rat hippocampus. **J Comp Neurol.** 198(2):335-50.

Gamache, K., Pitman, R.K., Nader, K. 2012. Preclinical evaluation of reconsolidation blockade by clonidine as a potential novel treatment for posttraumatic stress disorder.

Neuropsychopharmacol. 37:2789-2796.

Gannon, R.L., Terrian, D.M. 1991. Presynaptic modulation of glutamate and dynorphin release by excitatory amino acids in the guinea-pig hippocampus. **Neurosci.** 41:401-410.

Gazarini, L., Stern, C.A., Carobrez, A.P., Bertoglio, L.J., 2013. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting α 1- and β -adrenergic receptors. **Learn Mem.** 20:210-219.

Gazarini, L., Stern, C.A., Piornedo, R.R., Takahashi, R.N., Bertoglio, L.J. 2014. PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. **Int J Neuropsychopharmacol.** 18(1):31.

Genro, B.P., De Oliveira Alvares, L., Quillfeldt, J.A. 2012. Role of TRPV1 in consolidation of fear memories depends on the averseness of the conditioning procedure. **Neurobiol Learn Mem.** 97 355-360.

Ghirlanda, S., Enquist, M. 2003. A century of generalization. **Anim Behav.** 66:15-36.

Ghosh, S., Chattarji, S. 2015. Neuronal encoding of the switch from specific to generalized fear. **Nat. Neurosci.** 18:112-120.

Gisquet-Verrier, P., Riccio, D.C. 2012. Memory reactivation effects independent of reconsolidation. **Learn Mem.** 19(9):401-409.

Goldstein, A., Fischli, W., Lowney, L.I., Hunkapiller, M., Hood, L. 1981. Porcine pituitary dynorphin: complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 78:7219-7223.

Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L.I., Hunkapiller, M., Hood, L. 1979. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 76:6666-6670.

Goshen, I., Brodsky, M., Prakash, R., Wallace, J., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K. 2011. Dynamics of retrieval strategies for remote memories. **Cell.** 147(3):678-89.

Guitton, M.J., Dudai, Y. 2004. Anxiety-like state associates with taste to produce conditioned taste aversion. **Biol Psychiatr.** 56:901-904.

Guttman, N., Kalish, H.I. 1956. Discriminability and stimulus generalization. **J Experim Psych.** 51:79-88.

Hamann, S. 2001. Cognitive and neural mechanisms of emotional memory. **Trends Cogn Sci.** 5(9):394-400.

Hardt, O., Einarsson, E.O., Nader, K. 2010. A bridge over troubled water: reconsolidation as a link between cognitive and neuroscientific memory research traditions. **Annu Rev Psychol.** 61:141-167.

Harris, E.W., Ganong, A.H., Cotman, C.W. 1984. Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. **Brain Res.** 323(1):132-137.

Haubrich, J. Crestani, A.P., Cassini, L.F., Santana, F., Sierra, R.O., De Oliveira Alvares, L., Quilfeldt, J.A. 2015. Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. **Neuropsychopharmacol.** 2015;40:315–326.

Hebb, D.O. 1949. **The organization of behavior: A neuropsychological theory**, Wiley: New York.

Henry, D.J., Grandy, D.K., Lester, H.A., Davidson, N., Chavkin, C. 1995. Kappa-opioid receptors couple to inwardly rectifying potassium channels when coexpressed by *Xenopus* oocytes. **Mol Pharmacol.** 47(3):551-7.

- Horan, P., Taylor, J., Yamamura, H.I., Porreca, F. 1992. Extremely long-lasting antagonistic actions of nor-binaltorphimine (nor-BNI) in the mouse tail-flick test. **J Pharmacol Exp Therapeut.** 260:1237-1243.
- Huckleberry, K.A., Ferguson, L.B., Drew, M.R. 2016. Behavioral mechanisms of context fear generalization in mice. **Learn Mem.** 23(12):703-709.
- Huff, N.C., Frank, M., Wright-Hardesty, K., Sprunger, D., Matus-Amat, P., Higgins, E., Rudy, J.W. 2006. Amygdala regulation of immediate-early gene expression in the hippocampus induced by contextual fear conditioning. **J Neurosci.** 26:1616:1623.
- Iverfeldt, K., Serfözö, P., Diaz, A.L., Bartfai, T. 1989. Differential release of coexisting neurotransmitters: frequency dependence of the efflux of substance P, thyrotropin releasing hormone and [3H]serotonin from tissue slices of rat ventral spinal cord. **Acta Physiol Scand.** 137:63–71.
- Izquierdo, I., Medina, J.H., Vianna, M.R., Izquierdo, L.A., Barros, D.M. 1999. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behav Brain Res.** 103:1-11.
- Jarome, T.J., Thomas, J.S., Lubin, F.D. 2014. The epigenetic basis of memory formation and storage. **Prog Mol Biol Transl Sci** 128:1-27.
- Jay, T.M., Witter, M.P. 1991. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin. **J Comp Neurol.** 313:574-586.
- Joëls, M., Fernandez, G., Roozendaal, B. 2011. Stress and emotional memory: a matter of timing. **Trends Cogn Sci.** 15(6):280-288.
- Johansen, J.P., Cain, C.K., Ostroff, L.E., LeDoux, J.E. 2011. Molecular mechanisms of fear learning and memory. **Cell.** 147(3):509-524.

- Jones, D.N., Holtzman, S.G. 1992. Long term kappa-opioid receptor blockade following nor-binaltorphimine. **Eur J Pharmacol.** 215:345-348.
- Kaouane, N., Porte, Y., Vallée, M., Brayda-Bruno, L., Mons, N., Calandreau, L., Marighetto, A., Piazza, P.V., Desmedt, A. 2012. Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. **Science.** 335:1510-1513.
- Kilpatrick, D.G. Resnick, H.S., Milanak, M.E., Miller, M.W., Keyes, K.M., Friedman, M.J. 2013. National estimates of exposure to traumatic events and PTSD prevalence using DSM-IV and DSM-5 criteria. **J Trauma Stress.** 26(5):537-547.
- Kishi, T., Tsumori, T., Yokota, S., Yasui, Y. 2006. Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat. **J Comp Neurol.** 496:349-368.
- Kjelstrup, K.G., Tuvnes, F.A., Steffenach, H.A., Murison, R., Moser, E.I., Moser, M.B. 2002. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 99:10825-10830.
- Kneussel, M., Hausrat, T.J. 2016. Postsynaptic neurotransmitter receptor reserve pools for synaptic potentiation. **Trends in Neurosci.** 39 (3):170–182.
- Knoll, A.T., Carlezon, W.A.Jr. 2010. Dynorphin, stress, and depression. **Brain Res.** 1314:56-73.
- Kwak, C., Choi, J.H., Bakes, J.T., Lee, K., Kaang, B.K. 2012. Effect of intensity of unconditional stimulus on reconsolidation of contextual fear memory. **Korean J Physiol Pharmacol.** 16:293-296.
- Landeira-Fernandez, J., DeCola, J.P., Kim, J.J., Fanselow, M.S. 2006. Immediate shock deficit in fear conditioning: Effects of shock manipulations. **Behav Neurosci.** 120:873–879.

Lashley, K.S., Wade, M. 1946. The Pavlovian theory of generalization. **Psych Rev.** 53:72-87

Lechner, H.A., Squire, L.R., Byrne, J.H. 1999. 100 years of consolidation-remembering Müller and Pilzecker. **Learn Mem.** 6(2):77-87.

Lee, J.L. 2008. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. **Nat Neurosci.** 11: 1264-1266.

Lee, J.L. 2009. Reconsolidation: maintaining memory relevance. **Trends Neurosci.** 32:413-420.

Lee, J.L. 2010. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. **Front Behav Neurosci.** 4:168

Lee, J.L.C., Everitt, B.J., Thomas, K.L. 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science.** 304(5672):839-843.

Lee, J.L.C., Flavell, C.R. 2017. Inhibition and enhancement of contextual fear memory destabilization. **Front Behav Neurosci.** 8:144.

Lewis, Donald J. 1979. Psychobiology of active and inactive memory. **Psychol Bull.** 86(5):1054-1979.

Logrip, M.L., Janak, P.H., Ron, D. 2008. Dynorphin is a downstream effector of striatal BDNF regulation of ethanol intake. **FASEB J.** 22:2393-2404.

Loh, R., Chau, L., Aijaz, A., Wu, K., Galvez, R. 2017. Antagonizing the different stages of Kappa opioid receptor activation selectively and independently attenuates acquisition and consolidation of associative memories. **Behav Brain Res.** 323:1-10.

Lohse, M.J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. 1992. Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence

and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. **J Biol Chem.** 267:8558-8564.

Lord, J.A.H., Waterfield, A.A., Hughes, J. Kosterlitz, H.W. 1977. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. **Nature.** 267:495–499

Lubin, F.D., Roth, T.L., Sweatt, J.D., 2008. Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. **J Neurosci.** 28:10576-10586.

Lundberg, J.M., Anggard, A., Fahrenkrug, J., Lundgren, G., Holmstedt, B. 1981. Corelease of VIP and acetylcholine in relation to blood flow and salivary secretion in cat submandibular salivary gland. **Acta Physiol Scand.** 115:525-528.

Lundberg, J.M., Hokfelt, T. 1983. Coexistence of peptides and classical neurotransmitters. **Trends Neurosci.** 6:325-333.

Lynch, G., Rex, C.S., Gall, C.M. 2007. LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. **Neuropharmacol.** 52(1):12-23.

Mactutus, C.F., Riccio, D.C., Ferek, J.M. 1979. Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. **Science.** 204(4399):1319-1320.

Maldonado, N.M., Martijena, I.D., Molina, V.A. 2011. Facilitating influence of stress on the consolidation of fear memory induced by a weak training: Reversal by midazolam pretreatment. **Behav Brain Res.** 225:77-84.

Malin, E.L., Mcgaugh, J.L. 2006. Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 103(6):1959-1963.

Mansour, A., Fox, C.A., Thompson, R.C., Akil, H., Watson, S.J. 1994. Mu-opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to mu-receptor binding. **Brain Res.** 643:245-265.

Mansson, E., Bare, L., Yang, D.M. 1994. Isolation of a human kappa opioid receptor cDNA from placenta. **Biochem Biophys Res Commun.** 202:1431-1437.

Maren, S., Phan, K.L., Liberzon, I. 2013. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. **Nat Rev Neurosci.** 14:417-428

Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E., Gilbert, P.E. 1976. The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. **J Pharmacol Exp Therapeut.** 197:517-532.

McGaugh, J.L. 2000. Memory-a century of consolidation. **Science.** 287:248-251.

McGaugh, J.L. 2013. Making lasting memories: Remembering the significant. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 110:10402-10407.

McIntyre, C.K., McGaugh, J.L., Williams, C.I. 2012. Interacting brain systems modulate memory consolidation. **Neurosci Biobehav Rev.** 36(7):1750-1762.

McIntyre, C.K., Miyashita, T., Setlow, B., Marjon, K.D., Steward, O., Guzowski, J.F., McGaugh, J.L. 2005. Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 102:10718-10723.

McKenzie, S., Eichenbaum, H. 2011. Consolidation and reconsolidation: Two lives of memories? **Neuron.** 71:224-233.

McLean, S., Rothman, R.B., Jacobson, A.E., Rice, K., Herkenham, M. 1987. Distribution of opiate receptor subtypes and enkephalin and dynorphin immunoreactivity in the hippocampus of the squirrel, guinea pig, rat, and hamster. **J Comp Neurol.** 255:497-510.

Meng, F., Xie, G.X., Thompson, R.C., Mansour A., Goldstein, A., Watson, S.J., Akil, H. 1993. Cloning and pharmacological

characterization of a rat K opioid receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 90:9954-9958.

Merlo, E., Milton, A.L., Goozée, Z.Y., Theobald, D.E., Everitt, B.J. 2014. Reconsolidation and extinction are dissociable and mutually exclusive processes: Behavioral and molecular evidence. **J Neurosci.** 34(7):2422-2431.

Milner, B., Squire, L.R., Kandel, E. 1998. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron.** 20:445-468.

Minamino, N., Kangawa, K., Fukuda, A., Matsuo, H., Igarashi, M. 1980. A new opioid octapeptide related to dynorphin from porcine hypothalamus. **Biochem Biophys Res Commun.** 95:1475-1481.

Misanin, J.R., Miller, R.R., Lewis, D.J. 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. **Science** 160:203-204.

Miyamoto, E. 2006. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. **J Pharmacol Sci.** 100(5):433-442.

Morris, R.G., Inglis, J., Ainge, J.A., Olverman, H.J., Tulloch, J., Dudai, Y., Kelly, P.A. 2006. Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. **Neuron.** 50:479-489.

Moser, M.B., Moser, E.I., Forrest, E., Andersen, P., Morris, R.G. 1995. Spatial learning with a minilab in the dorsal hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 92:9697–9701.

Moser, M.B., Moser, E.I. 1998. Functional differentiation in the hippocampus. **Hippocampus.** 8:608–619

Mowrer, O.H., Miller, N.E. 1942. A multi-purpose learning-demonstration apparatus. **J Exp Psychol.** 31(2):163-170.

Müller, G.E., Pilzecker, A. 1900. **Experimentelle beiträge zur lehre vom gedächtniss.** JA Barth.

Nader, K., Hardt, O. 2009. A single standard for memory: the case for reconsolidation. **Nat Rev Neurosci.** 10(3):224-234.

Nader, K., Schafe, G.E., LeDoux, J.E. 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature.** 406(6797):722-726.

Neves, G., Cooke, S.F., Bliss, T.V. 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. **Nat Rev Neurosci.** 9(1):65-75.

Nock, B., Rajpara, A., O'Connor, L.H., Cicero, T.J. 1988. Autoradiography of [³H]U-69593 binding sites in rat brain: evidence for kappa opioid receptor subtypes. **Eur J Pharmacol.** 154:27-34

Ogren, S.O., Kuteeva, E., Elvander-Tottie, E., Hokfelt, T. 2010. Neuropeptides in learning and memory processes with focus on galanin. **Eur J Pharmacol.** 626(1):9-17.

Onat. S., Büchel, C. 2015. The neuronal basis of fear generalization in humans. **Nat Neurosci.** 18(12):1811-8.

Pavlov, I.P. 1927. **Conditioned reflexes.** London: Oxford University Press.

Paxinos, G., Watson, C. 2009. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** (2nd ed.). San Diego: Academic Press.

Pedraza, L.K., Sierra, R.O., Lotz, F.N., Alvares, L.O. 2018. Periodical reactivation under the effect of caffeine attenuates fear memory expression in rats. **Sci Rep.** 8(1):7260.

Pedreira, M.E., Perez-Cuesta, L.M., Maldonado, H. 2002. Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. **J Neurosci.** 22: 8305-8311.

Pedreira, M.E., Pérez-Cuesta, L.M., Maldonado, H. 2004. Mismatch between what is expected and what actually occurs

triggers memory reconsolidation or extinction. **Learn Mem.** 11(5):579-585.

Pert, C.B., Snyder, S.H. 1973. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. **Science.** 179:1011-1014.

Perusini, J.N., Fanselow, M.S. 2015. Neurobehavioral perspectives on the distinction between fear and anxiety. **Learn Mem.** 22(9):417-425.

Pfeiffer, A., Brantl, V., Herz, A., Emrich, H.M. 1986. Psychotomimesis mediated by kappa opiate receptors. **Science.** 233:774-6.

Phillips, R.G., LeDoux, J.E. 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behav Neurosci.** 106(2):274-285.

Pitkänen, A. 2000. **Connectivity of the rat amygdaloid complex.** In: Aggleton, J.P. (ed.). The amygdala. London: Oxford University Press. 31-117.

Pitman, R.K. 1989. Post-traumatic stress disorder, hormones, and memory. **Biol Psychiatry.** 26:221-223.

Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M.L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., Kobalz, U., Stawrakakis, A., Fernandez, E., Waltereit, R., Bicksander, A., Therstappen, E., Cooke, S.F., Blanquet, V., Wurst, W., Salmen, B., Bösl, M.R., Lipp, H.P., Grant, S.G., Bliss, T.V., Wolfer, D.P., Kuhl, D. 2006. Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. **Neuron.** 52(3):437-444.

Pothuizen, H.H., Zhang, W.N., Jongen-Relo, A.L., Feldon, J., Yee, B.K. 2004. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. **Eur J Neurosci.** 19:705-712.

Przybylski, J., Sara, S.J. 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. **Behav Brain Res.** 84(1):241-246.

Quirk, G.J., Mueller, D. 2008. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacol.** 33(1):56-72.

Quirk G. J., Pare D., Richardson R., Herry C., Monfils M. H., Schiller D., Vicentic, A. 2010. Erasing fear memories with extinction training. **J Neurosci.** 30:14993-14997.

Rácz, B., Halasy, K. 2003. Kappa-opioid receptor in the rodent hippocampus: a comparative immunocytochemical study in the rat, guinea pig, hamster and gerbil. **Acta Biol Hung.** 54(1):45-53.

Rekling, J.C. 1993. Effects of met-enkephalin on GABAergic spontaneous miniature IPSPs in organotypic slice cultures of the rat hippocampus. **J Neurosci.** 13:1954-1964.

Richter-Levin, G., Akirav, I. 2003. Emotional tagging of memory formation-In the search for neural mechanisms. **Brain Res Rev.** 43:247-256.

Rives, M.L., Rossillo, M., Liu-Chen, L.Y., Javitch, J.A. 2012. 6'-Guanidinonaltrindole (6'-GNTI) is a G protein-biased κ -opioid receptor agonist that inhibits arrestin recruitment. **J Biol Chem.** 287(32):27050-4.

Roesler, R., Reolon, G.K., Martins, M.R., Luft, T., Schröder, N., Vianna, M.R., Quevedo, J. 2005. NMDA receptors mediate consolidation of contextual memory in the hippocampus after context preexposure. **Neurochem Res.** 30(11):1407-1411.

Rosas-Vidal, L.E., Do-Monte, F.H., Sotres-Bayon, F., Quirk, G.J. 2014. Hippocampal-prefrontal BDNF and memory for fear extinction. **Neuropsychopharmacol.** 39(9):2161-2169.

Rozeske, R.R., Valerio, S., Chaudun, F., Herry, C. 2014. Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. **Genes Brain Behav.** 14:22-36.

- Rusin, K.I., Giovannucci, D.R., Stuenkel, E.L., Moises, H.C. 1997. κ -opioid receptor activation modulates Ca^{2+} currents and secretion in isolated neuroendocrine nerve terminals. **J Neurosci.** 17:6565-6574.
- Salin, P.A., Weisskopf, M.G., Nicoll, R.A. 1995. A comparison of the role of dynorphin in the hippocampal mossy fiber pathway in guinea pig and rat. **J Neurosci.** 15:6939-6945.
- Sandin, J., Nylander, I., Georgieva, J., Schott, P.A., Ogren, S.O., Terenius, L. 1998. Hippocampal dynorphin B injections impair spatial learning in rats: a kappa-opioid receptor mediated effect. **Neurosci.** 85:375-382.
- Sangha, S., Scheibenstock, A., Lukowiak, K. 2003. Reconsolidation of a long-term memory in *Lymnaea* requires new protein and RNA synthesis and the soma of right pedal dorsal 1. **J Neurosci.** 23:8034-8040.
- Sara, S.J. 2000. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. **Learn Mem.** 7(2):73-84.
- Schafe, G., Bauer, E., Rosis, S., Farb, C., Rodrigues, S., LeDoux, J. 2005. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. **Eur J Neurosci.** 22:201-211.
- Schneider, A.M., Sherman, W. 1968. Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. **Science.** 159(3811):219-221.
- Schultz, C., Engelhardt, M. 2014. Anatomy of the hippocampal formation. **Front Neurol Neurosci.** 34:6-17.
- Schwartz, J.C., Maifroy, B., De La Baume, S. 1981. Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxypeptidase ("enkephalinase") as neuropeptidase. **Life Sci.** 29:1715-40.

- Sevenster, D., Beckers, T., Kindt, M. 2012. Retrieval *per se* is not sufficient to trigger reconsolidation of human fear memory. **Neurobiol Learn Mem.** 97(3):338-345.
- Shirayama, Y., Ishida, H., Iwata, M., Hazama, G.I., Kawahara, R., Duman, R.S., 2004. Stress increases dynorphin immunoreactivity in limbic brain regions and dynorphin antagonism produces antidepressant-like effects. **J Neurochem.** 90:1258-1268.
- Simmons, M.L., Chavkin, C. 1996. Endogenous opioid regulation of hippocampal function. **Int Rev Neurobiol.** 39:145-196.
- Simmons, M.L., Terman, G.W., Drake, C.T., Chavkin, C. 1994. Inhibition of glutamate release by pre-synaptic kappa 1-opioid receptors in the guinea pig dentate gyrus. **J Neurophysiol.** 72(4):1697-1705.
- Simon, E.J., Hiller, J.M., Edelman, I. 1973. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic [³H]etorphine to rat-brain homogenate. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 70:1947-1949.
- Simonin, F., Gavériaux-Ruff, C., Befort, K., Matthes, H., Lannes, B., Micheletti, G., Mattei, M.G., Charron, G., Bloch, B., Kieffer, B. 1995. Kappa opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology and expression pattern in the central nervous system. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 92:7006-7010.
- Sotres-Bayon, F., Quirk, G.J. 2010. Prefrontal control of fear: more than just extinction. **Curr Opin Neurobiol.** 20(2):231-235.
- Sparta, D.R., Smithuis, J., Stamatakis, A.M., Jennings, J.H., Kantak, P.A., Ung, R.L., Stuber, G.D. 2014. Inhibition of projections from the basolateral amygdala to the entorhinal cortex disrupts the acquisition of contextual fear. **Front Behav Neurosci.** 8:129.
- Stern, C.A., Gazarini, L., Takahashi, R.N., Guimarães, F.S., Bertoglio, L.J. 2012. On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: Evidence from cannabidiol treatment. **Neuropsychopharmacol.** 37:2132-4212.

- Stern, C.A., Da Silva, T.R., Raymundi, A.M., De Souza, C.P., Hiroaki-Sato, V.A., Kato, L., Guimarães, F.S., Andreatini, R., Takahashi, R.N., Bertoglio, L.J. 2017. Cannabidiol disrupts the consolidation of specific and generalized fear memories via dorsal hippocampus CB₁ and CB₂ receptors. **Neuropharmacol.** 125:220-230.
- Suzuki, A. Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A.J., Kida, S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **J Neurosci.** 24(20):4787-4795.
- Suzuki, T., Shiozaki, Y., Masukawa, Y., Nagase, H. 1992. Role of mu and kappa-opioid receptors in cocaine-induced conditioned place preference. **Jpn J Pharmacol.** 58:435-442.
- Svoboda, K.R., Lupica, C.R. 1998. Opioid inhibition of hippocampal interneurons via modulation of potassium and hyperpolarization-activated cation (I_h) currents. **J Neurosci.** 18:7084-7098.
- Takemori, A.E., Ho, B.Y., Naeseth, J.S., Portoghese, P.S. 1988. Nor-binaltorphimine, a highly selective kappa-opioid antagonist in analgesic and receptor binding assays. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 246:255-258.
- Tanaka, K.Z., Pevzner, A., Hamidi, A.B., Nakazawa, Y., Graham, J., Wiltgen, B.J. 2014. Cortical representations are reinstated by the hippocampus during memory retrieval. **Neuron.** 84:347-354
- Taussig, R., Iniguez-Lluhi, J.A., Gilman, A.G. 1993. Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha. **Science.** 261:218-221.
- Terenius, L. 1973. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** 32:317-320.
- Terrian, D.M., Johnston, D., Claiborne, B.J., Ansah-Yiadom, R., Strittmatter, W.J., Rea, M.A. 1988. Glutamate and dynorphin

release from a subcellular fraction enriched in hippocampal mossy fiber synaptosomes. **Brain Res Bull.** 21:343-351.

Teschemacher, H., Opheim, K.E., Cox, B.M., Goldstein, A. 1975. A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. I. Isolation. **Life Sci.** 16:1771-1775.

Tronson, N.C., Taylor, J.R. 2007. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. **Nat Rev Neurosci.** 8(4):262-275.

Troyner, F., Bicca, M.A., Bertoglio, L.J. 2018. Nucleus reuniens of the thalamus controls fear memory intensity, specificity and long-term maintenance during consolidation. **Hippocampus.** [Epub ahead of print]

Tulving, E. 1983. **Elements of Episodic Memory.** Oxford: Clarendon Press.

Turner, A.J. 1998. **Membrane alanyl aminopeptidases.** In: Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. (eds) Handbook of proteolytic enzymes. Academic, San Diego. 996–1000.

Unterwald, E.M., Knapp, C., Zukin, R.S. 1991. Neuroanatomical localization of kappa 1 and kappa 2 opioid receptors in rat and guinea pig brain. **Brain Res.** 562:57–65.

Van-Elzaker, M.B., Dahlgren, M.K., Davis, F.C., Dubois, S., Shin, L.M. 2014. From Pavlov to PTSD: the extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. **Neurobiol Learn Mem.** 113:3-18.

Vanvossen, A.C., Portes, M.A.M., Scoz-Silva, R., Reichmann, H.B., Stern, C.A.J., Bertoglio, L.J. 2016. Newly acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prelimbic cortex NMDA receptors. **Neurobiol Learn Mem.** 137:154-162.

Vertes, R.P. 2006. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. **Neurosci.** 142(1):1-20.

- Vincent, S.B. 1915. The white rat and the maze problem: The introduction of a visual control. **J Anim Behav.** 5(1):1-24.
- Volianskis, A., France, G., Jensen, M.S., Bortolotto, Z.A., Jane, D.E., Collingridge G.L. 2015. Long-term potentiation and the role of Nmethyl-d-aspartate receptors. **Brain Res.** 1621:5-16.
- Wagner, J.J., Caudle, R.M., Chavkin, C. 1992. Kappa opioids decrease excitatory transmission in the dentate gyrus of the guinea pig hippocampus. **J Neurosci.** 12:132-141.
- Wagner, J.J., Evans, C.J., Chavkin, C. 1991. Focal stimulation of the mossy fibers releases endogenous dynorphin that bind kappa 1-opioid receptors in guinea pig hippocampus. **J Neurochem.** 57:333-343.
- Wagner, J.J., Terman, G.W., Chavkin, C. 1993. Endogenous dynorphins inhibit excitatory neurotransmission and block LTP induction in the hippocampus. **Nature.** 363:451-454.
- Walker, M.P., Brakefield, T., Hobson, J.A., Stickgold, R. 2003. Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation. **Nature.** 425:616-620.
- Walsh, S.L., Strain, E.C., Abreu, M.E., Bigelow, G.E. 2001. Enadoline, a selective kappa opioid agonist: comparison with butorphanol and hydromorphone in humans. **Psychopharmacol.** 157:151-62.
- Wang, J.B., Johnson, P.S., Persico, A.M., Hawkins, A.L., Griffin, C.A., Uhl, G.R. 1994. Human mu opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. **FEBS Lett.** 338:217-222.
- Watson, S.J., Khachaturian, H., Taylor, L., Fischli, W., Goldstein, A., Akil, H. 1983. Pro-dynorphin peptides are found in the same neurons throughout rat brain: immunocytochemical study. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 80:891-894.
- Weisskopf, M.G., Zalutsky, R.A., Nicoll, R.A. 1993. The opioid peptide dynorphin mediates heterosynaptic depression of

hippocampal mossy fibre synapses and modulates long-term potentiation. **Nature**. 362:423-427.

Westbrook, R. F., Iordanova, M., McNally, G., Richardson, R., Harris, J.A. 2002. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus: two roles for context. **J Exp Psychol Anim Behav Process**. 28(1):97.

Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., Bear, M.F. 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. **Science**. 313(5790):1093-1097.

Willner, P. 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiol**. 52(2):90-110.

Winocur, G., Moscovitch, M., Sekeres, M. 2007. Memory consolidation or transformation: context manipulation and hippocampal representations of memory. **Nat Neurosci**. 10(5):555-7.

Yehuda, R., Joëls, M., Morris, R.G. 2010. The memory paradox. **Nat Rev Neurosci**. 11(12):837-839.

Zafra, F., Castren, E., Thoenen, H., Lindholm, D., 1991. Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 88:10037-41.

Zafra, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H., Lindholm, D. 1990. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. **EMBO J**. 9:3545-50.

Zhang, H., Shi, Y.G., Woods, J.H., Watson, S.J., Ko, M.C. 2007. Central kappa-opioid receptor-mediated antidepressant-like effects of nor-Binaltorphimine: behavioral and BDNF mRNA expression studies. **Eur J Pharmacol**. 570:89-96.

Zukin, R.S., Eghbali, M., Olive, D., Unterwald, E.M., Tempel, A. 1988. Characterization and visualization of rat and guinea pig brain kappa opioid receptors: evidence for kappa 1 and kappa 2 opioid receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 85:4061-4065.

PRODUÇÃO RELACIONADA

Vanz, F., Bicca, M.A., Linartevichi, V.F., Giachero, M., Bertoglio L.J., Monteiro de Lima, T.C. 2018. Role of dorsal hippocampus κ opioid receptors in contextual aversive memory consolidation in rats. **Neuropharmacol.** 135:253-267.

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos promovidos pelo neuropeptídeo Y e pelos receptores Kapa-opioides no hipocampo dorsal de ratos nas diferentes etapas de formação e manutenção de memórias aversivas", protocolada sob o CEUA nº 9771250417, sob a responsabilidade de **Therese Christina Monteiro de Lima** e *equipe; Felipe Vanz* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 04/08/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of effects mediated by neuropeptide Y and kappa-opioid receptors in the dorsal hippocampus of rats at different stages of formation and maintenance of aversive memories", utilizing 1485 Heterogenics rats (1485 males), protocol number CEUA 9771250417, under the responsibility of **Therese Christina Monteiro de Lima** and *team; Felipe Vanz* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 08/04/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2017** a **08/2020**

Área: **Farmacologia**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **90 a 120 dias**

N: **1485**

Linhagem: **Rattus norvegicus/Wistar**

Peso: **290 a 330 g**

Resumo: O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é uma condição psiquiátrica debilitante, e um processo que parece ser crítico para o desenvolvimento deste transtorno é o aprendizado. Durante o aprendizado, ocorre à associação entre um estímulo aversivo com estímulos neutros, como um contexto, e esta associação é responsável por desencadear respostas de medo; isso é observado tanto em humanos como em animais. Nesse contexto, tanto os processos de aquisição, consolidação e reconsolidação de uma memória aversiva são importantes para o TEPT: esses processos são clinicamente relevantes, uma vez que as respostas de medo são mantidas ao longo do tempo. Algumas regiões cerebrais estão crucialmente envolvidas no processamento do medo e no desenvolvimento do TEPT. Dentre elas está o hipocampo dorsal, uma região particularmente importante no processamento de memórias e do estímulo contextual relacionado ao medo desenvolvido. Muitos neurotransmissores e neuromoduladores vêm sendo implicados na fisiopatologia do TEPT, especialmente no componente mnemônico dessa patologia. Nesse contexto, neuropeptídeos como a dinorfina e o neuropeptídeo Y (NPY), bem como, seus respectivos receptores kapa-opioides (k) e Y1 e Y2, vêm se destacando como importantes candidatos envolvidos na modulação de memórias aversivas. Em relação ao sistema opioide endógeno, tem sido demonstrado que pacientes com TEPT apresentam uma desregulação desse sistema, de maneira que menores ou maiores níveis de opióides endógenos foram encontrados nesses indivíduos. Em roedores, foi observado que a administração intra-hipocampal de agonistas seletivos k[Op]ioides promoveu redução da amplitude das respostas excitatórias neuronais nessa região. Dados prévios do nosso laboratório (não publicados) demonstraram que a administração intra-hipocampal de um antagonista seletivo kapa-opioides, a nor-binaltorfina, potencializou uma memória aversiva de medo, fato que sugere o envolvimento da dinorfina (principal ligante endógeno desse receptor) na regulação desse tipo de memória. Dessa forma, acredita-se que a ativação de receptores do tipo k-opioides promova, principalmente, a inibição da liberação de aminoácidos excitatórios (como por exemplo, o glutamato) a partir dos terminais pré-sinápticos. Essa informação é importante porque se sabe que a ativação de receptores NMDA mediada principalmente pelo glutamato, é de extrema importância para o processamento das memórias aversivas expressas no TEPT. Por outro lado, tem sido demonstrado que pacientes com TEPT apresentam baixos níveis de NPY no líquido cefalorraquidiano, enquanto que pessoas que sofreram uma situação traumática, mas não desenvolveram TEPT apresentam altos níveis desse neuropeptídeo, sugerindo a participação do mesmo no desenvolvimento desse transtorno. Ainda, foi demonstrado recentemente no nosso laboratório que a administração de NPY prejudica a consolidação de uma memória aversiva contextual forte, mas não uma memória de reconhecimento de objetos (memória neutra). Esse fato implica que o NPY poderia prejudicar apenas as memórias com caráter aversivo. Ainda, do ponto de vista clínico, seria extremamente interessante desenvolver fármacos capazes de prejudicar apenas aquelas memórias extremamente aversivas (patológicas), enquanto que aquelas memórias de menor grau de aversividade (memórias adaptativas) deveriam permanecer intactas. No entanto, se o efeito mediado pelo NPY também pode ser observado em



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



um protocolo de aprendizado que agora envolve menor grau de aversividade (teste do labirinto aquático de Morris) e que, assim como no protocolo de uma memória de medo contextual forte, também recruta o hipocampo, ainda não está claro. Portanto, o objetivo geral desse trabalho é o de investigar o papel do sistema k-opioide e do NPY presentes no hipocampo dorsal nas diferentes etapas de formação e manutenção de memórias aversivas utilizando os paradigmas de condicionamento aversivo contextual e do labirinto aquático de Morris, respectivamente. A hipótese de trabalho é de que o NPY e o sistema k-opioide participam do processamento das diferentes etapas de formação e manutenção de uma memória aversiva por meio da ativação dos seus receptores k-opioides e Y1 e Y2.

Local do experimento: Laboratório de neurofarmacologia - CCB- UFSC- Sala 307 (etapas comportamentais); Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) (análises moleculares); Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (contagem de espinhas dendríticas)

Florianópolis, 13 de agosto de 2018

Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Junior
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Maria Alcina Martins de Castro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina