

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

NIEGE ALVES

**A EXPOSIÇÃO À NOVIDADE MODULA A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA
E A SUA PERSISTÊNCIA**

Uruguaiiana

2019

NIEGE ALVES

**A EXPOSIÇÃO À NOVIDADE MODULA A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA E
A SUA PERSISTÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Pâmela Billig Mello Carpes

Uruguaiiana

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

A474e Alves, Niede

A exposição à novidade modula a extinção da memória
aversiva e a sua persistência / Niede Alves.
59 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, 2019.

"Orientação: Pâmela Billig Mello Carpes Mello-Carpes".

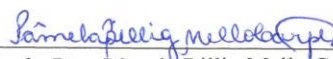
1. novidade. 2. persistência. 3. memória aversiva. 4.
esquiva inibitória. 5. dopamina. I. Título.

**A EXPOSIÇÃO À NOVIDADE MODULA A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA E A SUA
PERSISTÊNCIA**

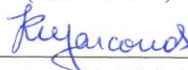
Dissertação apresentada ao Programa
Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências
Fisiológicas da Universidade Federal do
Pampa, como requisito para obtenção do Título
de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Dissertação de mestrado defendida e aprovado em: 27 de fevereiro de 2019.

Banca examinadora:



Prof. Dra. Pâmela Billig Mello Carpes
Orientadora
(UNIPAMPA)



Prof. Dra. Fernanda Klein Marcondes
(UNICAMP)



Prof. Dra. Liane da Silva de Vargas
(UNIPAMPA)

NIEGE ALVES

**A EXPOSIÇÃO À NOVIDADE MODULA A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA
E A SUA PERSISTÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Dissertação de mestrado defendida e aprovado em: 27 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a minha querida orientadora **Pâmela** por essa conquista e por tantas outras oportunidades ao longo destes mais de 8 anos juntas...foste e és um exemplo para mim! Obrigada por estar sempre disposta a compartilhar seus conhecimentos e experiência, pelo apoio e paciência. Jamais conseguiria mensurar tamanha gratidão...

À minha **família** pelo apoio incansável! Aprendi com vocês que um dos bens mais preciosos nesta vida é o conhecimento, portanto, sem dúvida nenhuma, esta conquista também é de vocês! Meu amor e admiração são eternos, obrigada infinitamente por tanto.

À mulher mais forte e doce que já conheci. À minha mãe, **Rosane**, meu eterno agradecimento. Foste o pilar de cada conquista minha, tua coragem e teu amor me impulsionaram durante toda essa trajetória. Agradeço por todo sacrifício e peço a Deus que eu saiba ser esse exemplo de mãe que tu foste e é para mim.

À **Homero Luzardo P. Filho**, meu amor e melhor amigo. Teu apoio, paciência e organização tornaram meu caminho mais fácil e feliz. Obrigada por trazer tanta luz e alegria à minha vida.

Aos colegas de trabalho, **GPfis**, pessoas queridas, com as quais compartilhei e aprendi sobre ciência e coletividade, o trabalho se tornou mais leve com vocês. Ninguém é tão alguém que não precise de ninguém...

À minha segunda família, **Homero**, **Cleonice** e **Gaby**, pessoas especiais que fizeram o que outros jamais fariam. Obrigada pelo apoio, ajuda, caronas, almoços... todo meu amor e gratidão a vocês!

Aos meus **professores de mestrado** que sempre se mostraram próximos aos seus alunos e nos incentivaram a seguir nosso caminho de maneira independente.

Ao **Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**, pela oportunidade no programa e por todo auxílio dado pelos funcionários e professores.

Aos **professores** que aceitaram fazer parte desta comissão examinadora e contribuir com seus conhecimentos!

À **CAPES** pela bolsa de estudos concedida.

Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz, mas acima de tudo, o que mais nos incentiva, o que mais nos valoriza e também nos torna mais conscientes da nossa responsabilidade é saber que os outros crêem em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos! ” (Albert Einstein)

RESUMO

A evocação de uma memória traumática pode ser inibida através de um processo chamado de extinção. A extinção tem grande aplicabilidade terapêutica no tratamento de fobias, como o TEPT. No entanto, embora seja largamente utilizada na prática clínica, a extinção ainda não apresenta resultados satisfatórios no que diz respeito a seus resultados a longo prazo. O objetivo desta dissertação foi avaliar os efeitos modulatórios da novidade sobre a extinção da memória aversiva, bem como a persistência destes efeitos e possível envolvimento do sistema dopaminérgico. Foram utilizados 37 ratos Wistar machos que foram divididos em cinco grupos de acordo com a intervenção utilizada. Os animais foram treinados na esQUIVA INIBITÓRIA (EI), uma tarefa comportamental aversiva, e 24 horas depois foram submetidos a três sessões de treinamento de extinção com intervalo de 90 min entre as sessões. Vinte e quatro horas, 3, 7, 14 e 21 dias após os animais foram submetidos a testes de retenção. Alguns animais foram expostos por 5 min a uma novidade (campo aberto desconhecido), 30 minutos antes da primeira sessão de extinção. Outros animais receberam uma microinjeção intra-hipocampal de dopamina 30 minutos antes da primeira sessão de extinção. No teste de retenção de 24 horas, verificamos que a novidade e a dopamina foram capazes de promover a extinção da memória aversiva, enquanto os animais controle não extinguiram a memória original. Nos testes de 3, 7, 14 e 21 dias os mesmos resultados foram observados, o que demonstra a persistência da memória de extinção. Ao contrário do campo aberto novo, a exposição a um campo aberto familiar não teve efeito. Tais resultados nos permitem concluir que a exposição a um ambiente novo promove a extinção da memória aversiva, efeito que está relacionado à exposição à novidade, uma vez que a exposição a um ambiente familiar não promoveu o mesmo efeito. Além disso, o efeito da novidade foi persistente e mimetizado pela infusão de dopamina no hipocampo, o que permite inferir que a participação deste neurotransmissor é um mecanismo importante para o efeito observado.

Palavras-Chave: novidade; persistência; memória aversiva; esQUIVA INIBITÓRIA; dopamina.

ABSTRACT

The recall of a traumatic memory can be inhibited through a process called extinction. The extinction has a great therapeutic applicability in the treatment of phobias such as PTSD. However, although widely used in clinical practice, extinction still does not yield satisfactory results in terms of its long-term results. The aim of this research was to evaluate the modulatory effects of novelty on the extinction of aversive memory, as well as the persistence of these effects and possible involvement of dopaminergic system. Male Wistar rats ($n = 37$) were divided into five groups according to the intervention used. The animals were trained in inhibitory avoidance (IA), an aversive behavioral task, and 24 hours later underwent three extinction training sessions with a 90 min interval between them. Twenty-four hours, 3, 7, 14 and 21 days after the animals were submitted to retention tests. Some animals were exposed for 5 min to a novelty (unknown open field) 30 minutes before the first extinction session. Other animals received an intra-hippocampal microinjection of dopamine 30 minutes before the first extinction session. In the 24 h retention test, we observed that novelty and the dopamine were able to promote the extinction of aversive memory, while control animals did not extinguish the original memory. In the 3, 7, 14 and 21 days tests the same results were observed, what demonstrates the persistence of extinction memory. Unlike the new open field, the exposure to a familiar open field had no effect. These results allow us to conclude that exposure to a new environment promotes the extinction of aversive memory, an effect that is related to exposure to novelty, since exposure to a familiar environment did not promote the same effect. In addition, the novelty effect was persistent and mimicked by the infusion of dopamine into the hippocampus, what allows to infer that the participation of this neurotransmitter is an important mechanism for the observed effects.

Keywords: novelty; persistence; aversive memory; inhibitory avoidance and dopamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação da memória de acordo com o tempo de duração.....	14
Figura 2. Desenho esquemático da região correspondente ao hipocampo em cérebro de mamíferos.....	16
Figura 3. Esquema dos principais circuitos neurais envolvidos na extinção e memória de medo.....	18
Figura 4. Desenho representativo da hipótese de marcação e captura sináptica.....	21
Figura 5. Desenho representativo das vias dopaminérgicas.....	22
Figura 6. Delineamento experimental.....	29
Figura 7. Imagem do aparato estereotáxico.....	30
Figura 8. Esquiva inibitória.....	31
Figura 9. Esquema representativo do protocolo de condicionamento (A), extinção (B) e testes de retenção (C) na Esquiva Inibitória.....	32
Figura 10. Campo aberto (novidade)	34
Figura 11. Labirinto em cruz elevado.....	36
Figura 12. Placa quente.....	37
Figura 13. A exposição à novidade (ambiente novo) promove a extinção da memória aversiva; este efeito não ocorre quando os animais são expostos a um ambiente familiar e a infusão de dopamina mimetiza os efeitos da novidade	39
Figura 14. A exposição à novidade (ambiente novo), bem como a infusão de dopamina facilitam a extinção da memória aversiva, sendo este efeito persistente.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. O efeito da infusão de dopamina hipocampal e a exposição à novidade não afeta a atividade locomotora e exploratória, ansiedade e sensibilidade álgica nos animais.....	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HIP – hipocampo
CA – corno de Ammon
DG – giro denteado
BLA – amígdala basolateral
IL – córtex infralímbicos
ITC – células intercalares da amígdala
DA – dopamina
SNC – sistema nervoso central
TH – tirosina hidroxilase
DOPA – Ldiidroxifenilalanina
i.p. – Intraperitoneal
µl – microlitro
MCD – memória de curta duração
MLD – memória de longa duração
EI – esquiva inibitória
STC – *Synaptic Tagging and Capture*
LTM – *Long-Term Memory*
LL – latero-lateral
mA – miliampére
min – minutos
CA – campo aberto
PQ – placa quente
LCE – labirinto em cruz elevado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.1 Definição e classificação das memórias.....	13
1.2 Extinção da memória.....	17
1.3 O transtorno do estresse pós-traumático e sua relação com a extinção de memórias.....	18
1.4 Novidade, dopamina e a extinção de memórias.....	19
2 JUSTIFICATIVA.....	24
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo principal.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Amostra.....	27
4.2 Procedimentos cirúrgicos.....	30
4.3 Manipulação dos animais.....	31
4.4 Condicionamento na esQUIVA inibitória.....	31
4.5 Treino de extinção.....	32
4.6 Testes de retenção e persistência da memória.....	33
4.7 Exposição a novidade (CA)	33
4.8 Exposição ao ambiente familiar	34
4.9 Drogas e injeção intrahipocampal.....	34
4.10 Experimentos comportamentais de controle.....	35
4.10.1 Labirinto em cruz elevado.....	35
4.10.2 Placa quente.....	36
4.10.3 Campo aberto.....	36
4.11 Análise estatística.....	37
5 RESULTADOS.....	39
6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÃO.....	48
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	49
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
10 ANEXO.....	59

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Definição e classificação das memórias

A memória pode ser definida como o registro de informações adquiridas que possibilitam alterações no comportamento oriundas de experiências ao longo da vida (XAVIER, 1996). Sabemos quem somos e onde estamos devido a nossa capacidade de aprender e lembrar. A forma pela qual nos relacionamos com o meio e nosso entendimento sobre o mundo estão intimamente associados à formação de nossas memórias (IZQUIERDO, 2002; SHARMA; RAKOCZY; SQUIRE et al., 2003). Portanto, as informações que são armazenadas pelo sistema nervoso central (SNC) e posteriormente são evocadas, referem-se à memória (BEAR, 2002; IZQUIERDO, 2002; SQUIRE et al., 2003).

As memórias são classificadas de acordo com o seu conteúdo e tempo de duração. De acordo com o seu conteúdo, as memórias podem ser divididas em duas grandes categorias: memória explícita (ou declarativa) e memória implícita (ou não declarativa/procedural) (IZQUIERDO, 2002). As memórias declarativas são aquelas que, como o próprio nome diz, podemos facilmente declarar, e podem ser referentes a eventos, lugares ou até mesmo informações sobre a fisionomia de pessoas (LONGONI, 2003). Dentre as estruturas nervosas responsáveis pela aquisição, consolidação e evocação das memórias declarativas, podemos citar o hipocampo, o córtex entorrinal e a amígdala (FUSTER, 1995., IZQUIERDO et al., 2006). As memórias declarativas são ainda subdivididas em memórias episódicas ou semânticas, que referem-se a eventos específicos que vivenciamos e a conhecimentos gerais adquiridos ao longo da vida, respectivamente (SQUIRE & KANDEL, 2003; IZQUIERDO, 2011). No que diz respeito as memórias implícitas, estruturas nervosas como o estriado, cerebelo, amígdala e neocórtex são as principais responsáveis pelos seus processos mnemônicos (SQUIRE, 1992). Estas informações correspondem às memórias relacionadas a habilidades motoras e também àquelas decorrentes de condicionamento clássico (BEAR, 2002; IZQUIERDO, 2002; SCHUCHARD; THOMPSON, 2013).

Quando classificadas de acordo com o tempo de duração, as memórias dividem-se em: memórias de trabalho, de curta e longa duração (IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000) (Figura 1). A memória de trabalho refere-se àquelas memórias que perduram por muito pouco tempo, de

segundos a minutos; são processadas pela atividade neural no córtex pré-frontal, região mais anterior do lobo frontal (IZQUIERDO, 2002; ZANTO et al., 2011).

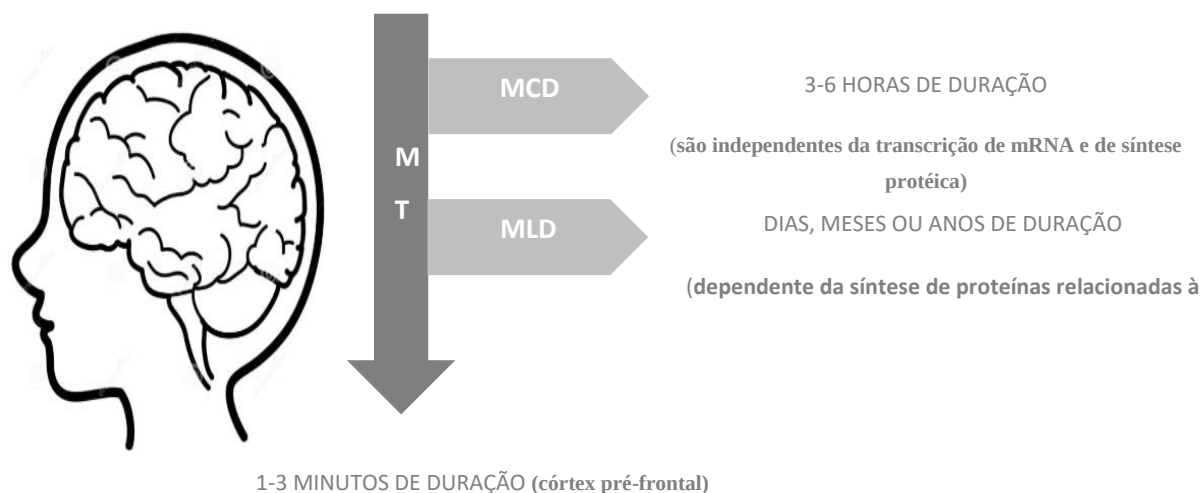


Figura 1 - Classificação da memória de acordo com o tempo de duração. MT = Memória de trabalho; MCD = Memória de curta duração; MLD = Memória de longa duração. (Figura adaptada de Izquierdo, I. 2002).

Representativamente, podemos dizer que a memória de trabalho (MT) equivale a memória RAM presente nos computadores: a informação é mantida ativa na MT durante segundos ou alguns minutos, enquanto ela é necessária. Ela é importante para o nosso dia a dia de forma a mantermos informações em uma janela de tempo necessária para darmos continuação à atividade que estávamos realizando anteriormente, mas não precisa formar arquivos. Outro exemplo de memória de trabalho é a terceira palavra da frase anterior: durou 2 ou 3 segundos na memória do leitor, para dar sentido à frase e conectá-la com a seguinte, mas já desapareceu de nossa memória para sempre (IZQUIERDO et al, 2013). Memórias que persistem por períodos mais longos que 3 segundos são classificadas em memórias de curta ou longa duração. Izquierdo e colaboradores, em 1998, demonstraram que a memória de curta e a de longa duração dependem de alguns processos fisiológicos distintos (IZQUIERDO et al., 1998).

As memórias de curta duração (MCD) persistem por tempo limitado, no máximo 6 horas, e utilizam-se de breves processos bioquímicos no córtex entorrinal e hipocampo, sendo formadas ininterruptamente, portanto, são independentes da transcrição de mRNA e de síntese protéica (SQUIRE et al., 2003). Nós usamos este tipo de memória para lembrar o que aconteceu há algumas horas atrás e dar continuidade ao nosso tempo presente (IZQUIERDO, 2002;

SQUIRE et al., 2003). Em contrapartida, a memória de longa duração (MLD) perdura muitas horas, dias ou anos. Sua formação envolve a ativação de numerosas enzimas que regulam a atividade de proteínas pré-existentes, e a ativação gênica por elas e síntese de novas proteínas, sendo este tipo de memória dependente da síntese de proteínas relacionadas à plasticidade (PRPs) (REDONDO E MORRIS, 2011). Esses processos bioquímicos e moleculares envolvidos na formação da MLD permitem que as células neurais se ramifiquem para formar conexões novas ou mais fortes (SQUIRE & KANDEL, 2003).

Enquanto a MLD está sendo formada a informação adquirida é lábil, portanto, tolera alterações e pode ser suscetível à administração de fármacos, à interferência de outras memórias ou à ação de neurotransmissores, como a dopamina e a acetilcolina, por exemplo (MOURÃO JÚNIOR, C. A.; FARIA, N. C., JAMES, W. 2015). Ainda, sua constância é dependente de outros fatores, tais como: o nível de ansiedade, estresse, atenção, a idade, entre outros (MEDINA et. al., 2008). Mesmo que as MCD e MLD não possuam mecanismos de formação iguais, ambas sofrem processamento na região hipocampal e em estruturas associadas do lobo temporal (BROADBENT et al., 2004).

Classicamente, o processo de formação de uma memória envolve 3 fases: *aquisição*, *consolidação* e *evocação*. Inicialmente, ocorre a aquisição da informação adquirida. Posteriormente, dar-se-á a consolidação, que consiste no processo no qual a informação será de fato armazenada no SNC, ou seja, ocorrerá a fixação do traço mnemônico (AKIRAV; MAROUN, 2012 ; ALBERINI; LEDOUX, 2013; DE LA CRUZ et al., 2008; IZQUIERDO et al., 2006; MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000). Por fim, essa informação já consolidada no SNC poderá ser evocada/lembrada, fase chamada de *evocação*, que corresponde à rápida recapitulação de uma informação previamente armazenada (MEI et al., 2011).

Diversas estruturas encefálicas são importantes para o funcionamento da circuitaria neural envolvida nos processos mnemônicos, porém podemos citar algumas que são essenciais. Dentre elas, a região hipocampal e estruturas associadas ao lobo temporal que são as responsáveis pelo processamento da MCD e MLD (BROADBEN et al., 2004). O hipocampo, estrutura pertencente à região hipocampal (figura 2), anatomicamente compreende as regiões denominadas CA1, CA2 e CA3 (BEAR et al., 1990) (do latim, *cornu ammonis* ou Corno de Amon – CA), contudo, a região CA1, além de ocupar a maior extensão da porção superior, é a principal

envolvida nos processos cognitivos relacionados à memória (FIORENZA et al., 2012; MYSKIW et al., 2013; MELLO-CARPES, 2010).

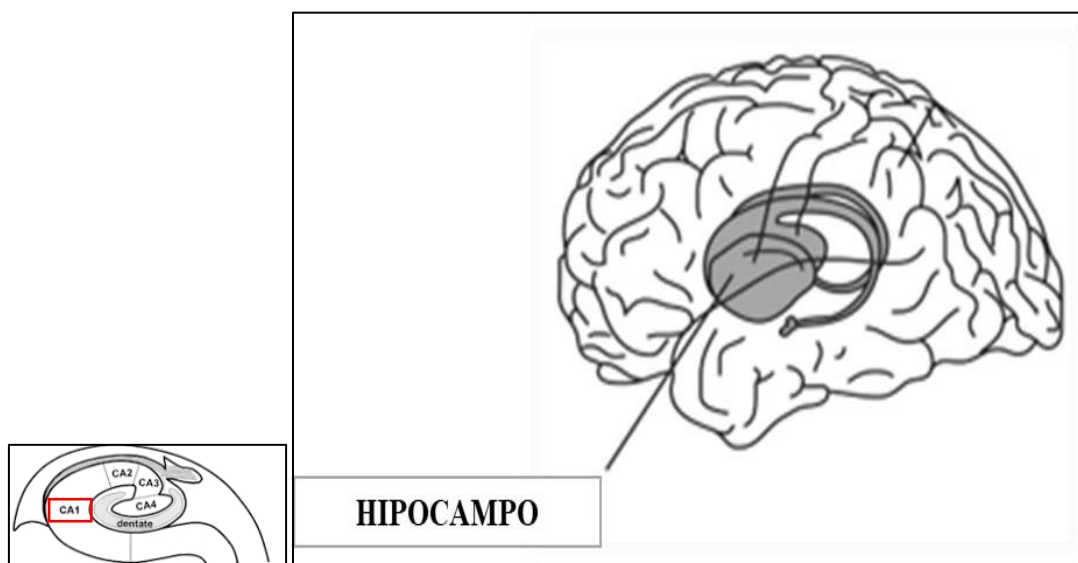


Figura 2. Desenho esquemático da região correspondente ao hipocampo em cérebro humano. O hipocampo é a principal região envolvida nos processos cognitivos relacionados a memória. A região CA1, além de ocupar a maior extensão da porção superior, é a principal envolvida nos processos cognitivos relacionados à memória (Adaptado de Pixabay, 2016).

Como mencionado previamente, as memórias que já foram consolidadas, quando são evocadas se tornam lábeis, podendo sofrer alterações. Após uma memória ser evocada, ela pode seguir dois caminhos distintos: a reconsolidação ou a extinção (ALBERINI; LEDOUX, 2013). Para que essa memória perdure ao longo do tempo, ela necessita passar pelo processo denominado reconsolidação (NADER et al., 2000). Através da reconsolidação as memórias pré-existentes são atualizadas (LEE et al., 2017), o que aumenta possibilidade de armazená-las por um tempo maior (NADER, 2000). Portanto, quando evocadas, as memórias reconsolidadas sofrem uma desestabilização seguida de posterior estabilização (DUDAI & EISENBERG, 2004). Já a extinção da memória, ao contrário do que se possa imaginar, não corresponde à perda de uma memória, apenas à sobreposição de uma nova memória à memória original, de forma a impedir ou diminuir a probabilidade de evocação da memória original; portanto, considera-se o processo de extinção como um novo aprendizado (MYSKIW et al., 2013).

1.2 Extinção da memória

Extinguir uma memória não significa esquecê-la; a memória esquecida não pode ser mais lembrada, já a memória extinta, perante condições específicas, pode (FLAVEL, MILLER, & MILLER, 1999, MOURÃO & FARIA, 2015). No início do século XX, o fisiologista e médico russo Ivan Pavlov descobriu um dos processos mnemônicos que seria, futuramente, o mais difundido dentro da psicanálise para a realização de terapias cognitivas: a extinção (IZQUIERDO, 2004). Pavlov estudou a extinção usando o modelo de condicionamento clássico ou condicionamento para memórias aversivas. Este modelo permite que o indivíduo (ou animal) relacione um estímulo sem relevância (estímulo condicionado) a outro estímulo que possui relevância intrínseca (estímulo incondicionado); assim, o estímulo condicionado ganha similar relevância ao estímulo incondicionado, resultando em respostas idênticas diante de ambas situações (NADER, 2000). Pavlov provocou aprendizado condicionado e depois promoveu a extinção deste aprendizado (IZQUIERDO, 2004).

A extinção está relacionada à otimização na ocupação de áreas do córtex cerebral (MOURÃO et al., 2015). Podemos afirmar que esse tipo de memória possui um grande valor adaptativo e nos impede de insistir na realização de comportamentos e pensamentos que já não se conectam mais com a realidade (IZQUIERDO, 2006). Semelhante à consolidação, para que os mecanismos de extinção possam ocorrer é necessária a expressão gênica e síntese de novas proteínas no hipocampo (IZQUIERDO et al., 2013). No entanto, as áreas encefálicas correspondentes não são as mesmas nos dois processos. Durante a extinção são ativadas regiões do sistema límbico, tais como o hipocampo, o estriado, a amígdala, a área motora suplementar e o córtex pré-frontal (AYBEK et al., 2015).

Sabe-se que tanto hipocampo quanto a amígdala tem um importante papel no circuito neural do medo (DUVARCI et al., 2014; ERLICH et al., 2009). Após a exposição ao condicionamento aversivo, a informação adquirida é processada pelo hipocampo que projeta essas informações para a amígdala basolateral (BLA) (Figura 3) (DUVARCI et al., 2014; ERLICH et al., 2009). Essa interação neural promove uma associação entre o estímulo aversivo e o contexto. Assim, quando reexposto ao contexto condicionado, o indivíduo ativa novamente o traço mnemônico, permitindo a ativação na BLA, que, por sua vez, emite projeções para a amígdala central, desencadeando respostas de medo (DUVARCI et al., 2014; EHRLICH et al., 2009; JANAK & TYE, 2015; PARE et al., 2012). Durante a extinção, células intercalares

localizadas na amígdala são acionadas após a ação excitatória de neurônios infralímbicos, e como resultado deste processo ocorre a inibição da amígdala central e basolateral, bloqueando a expressão do medo (Figura 3) (HERRY and JOHANSEN, 2014; MAREN et al, 2013).

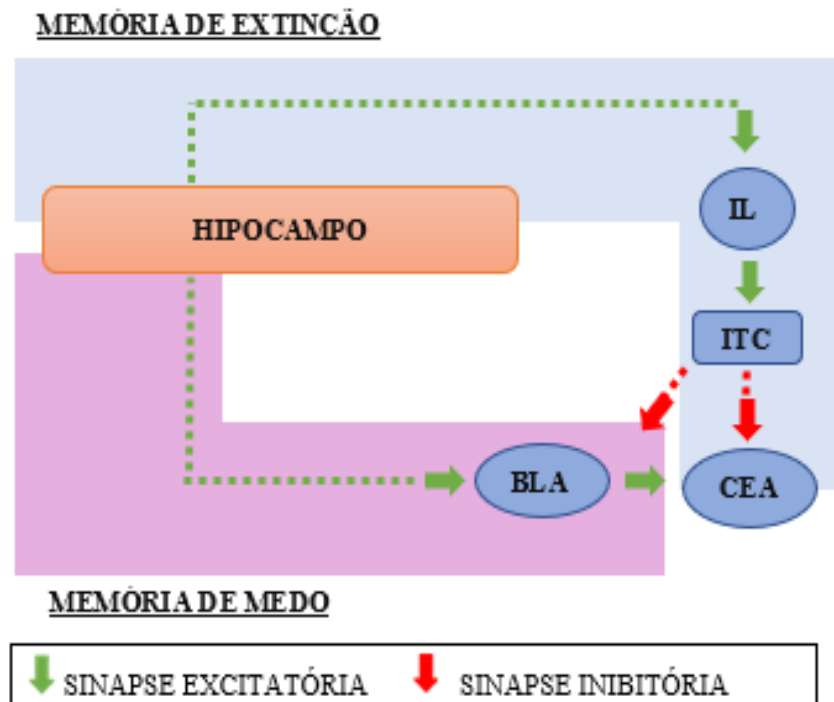


Figura 3. Esquema dos principais circuitos neurais envolvidos na extinção e memória de medo. Memórias aversivas contextuais são codificadas por circuitos envolvendo projeções hipocampais para a amígdala basolateral (BLA). Já na extinção, o circuito responsável por esta memória envolve projeções do hipocampo para o córtex infralímbico (IL) e deste para as células intercalares da amígdala (ITC), que por sua vez inibe a amígdala central (CEA) e BLA (Adaptado de MAREN et al., 2013).

1.3 O transtorno do estresse pós-traumático e sua relação com a extinção de memórias

Segundo o *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5, American Phychiatric Association, 2013)* considera-se como diagnóstico para o Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT) a vivência ou a exposição a um evento traumático que envolva risco ou ameaça à vida. O TEPT apresenta uma prevalência de 1% até 14% na população civil urbana, sendo esse índice significativamente elevado para 40% a 80% quando incluídas vítimas de violência sexual ou desastre natural (KESSLER et al., 1995).

As consequências emocionais após o trauma são latentes nos pacientes que desenvolvem TEPT, incluindo alterações neurovegetativas tais quais: taquicardia, hiperexcitabilidade,

irritabilidade, sudorese, raiva dentre outros sintomas que, em decorrência desta constante tensão, causam efeito deletério para a saúde, como alterações negativas de cognição/humor e perda de memória, que persistem por meses ou até mesmo anos após o evento (BARLOW, 2016). Assim, tanto a vida pessoal quanto a vida profissional do indivíduo que desenvolve o TEPT são afetadas drasticamente, pois as memórias relacionadas ao trauma estão muito vívidas, e são evocadas a todo momento como se fossem pequenos *flashbacks* durante o dia a dia (BLANCO & CANTO-DE-SOUZA, 2018; BARLOW, 2016).

Um dos tratamentos disponíveis, e largamente utilizado para tratar o TEPT é a terapia de exposição (IZQUIERDO et al., 1985). Nela o paciente é exposto a “dicas” associadas ao trauma, porém sem que de fato o evento traumático ocorra. O tratamento é baseado no processo de extinção da memória, no qual o indivíduo aprende a inibir a evocação da memória traumática a todo momento (RESCORLA, 2004). Entretanto, apesar de ser o tratamento de escolha, a eficácia desta terapia não é a que os profissionais gostariam: a diminuição das respostas aversivas relacionadas ao trauma após a terapia de exposição não é permanente, podendo reaparecer mediante o fenômeno denominado recuperação espontânea (RESCORLA, 2004).

Ainda, existem tratamentos farmacológicos que buscam amenizar os sintomas deste transtorno, como o uso dos estabilizadores de humor, como Carbamazepina, Benzodiazepínicos (BZDs), Inibidores de Monoamina Oxidase (IMAOs) e Inibidores Específicos da Recaptação de Serotonina (IERSs) (ANDRADE et al., 2018), porém alguns estudos mostram que a eficácia destes fármacos depende em grande parte do seu uso contínuo, portanto, a descontinuação farmacológica resultaria no retorno dos sintomas (ETTEN & TAYLOR, 1998; ANDRADE et al., 2018).

1.4 Novidade, dopamina e a extinção de memórias

A memória e a aprendizagem são variáveis dependentes que se relacionam de forma intrínseca, ou seja, para aprender é preciso memorizar e vice e versa (IZQUIERDO, 2002; 2004). Estes processos fisiológicos podem ser modulados a partir do nível de atenção e pelo estado de ânimo do indivíduo, portanto, para consolidar uma memória/aprendizado é necessário um estado mínimo de alerta (IZQUIERDO, 2002; 2004). Nesse sentido, novas abordagens estão sendo testadas para modular o traço mnemônico, dentre elas encontra-se a exposição à novidade (PIERCE, 1980). A adição de eventos novos ou surpreendentes poderia melhorar a aprendizagem de extinção a partir de novas experiências.

Estudos mostraram que, a simples exposição a um ambiente novo pode exercer profundos efeitos modulatórios nos processos de memória quando ocorre até 2 horas antes da aprendizagem, facilitando este processo (IZQUIERDO 2000; 1985). Moncada e colaboradores (2011) afirmam que as propriedades envolvidas no processo de exposição à novidade permitem que estímulos que formariam MCD (STMs -*Short-Term Memory*) possam formar MLD (LTMs -*Long-Term Memory*); processo esse processo que pode ser elucidado a partir do modelo proposto por Frey e Morris em meados de 1997: a hipótese da Marcação e Captura Sináptica (STC, do inglês para *synaptic tagging and capture*).

A hipótese da STC propõe que, para a modificação plástica na força sináptica dos neurônios, ou seja, a potenciação da comunicação entre os neurônios, é necessário que dois eventos independentes interajam para determinar a persistência da mudança do traço mnemônico: a expressão de Potenciação de Longa Duração (LTP, sigla em inglês *Long Term Potentiation*; fenômeno sinapse-específico que aumenta a potência sináptica em resposta à atividade) (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; REDONDO; MORRIS, 2011) de maneira precoce, e a marcação dessa sinapse por uma *tag*, ou seja, uma sinapse marcada. Segundo Redondo e Morris (2011) uma sinapse marcada nada mais é do que um estado temporário no qual a sinapse em questão está sensível à ação das PRPs (Proteínas Relacionadas à Plasticidade; proteínas constituídas por diversas subunidades que permitem o aumento estável do espinho dendrítico) (HAYASHI, 200; KOPEC et al., 2007) de forma a torná-la mais lábil à alterações prolongadas (REDONDO E MORRIS, 2011; BARCO et al., 2008).

A expressão das PRPs ocorre paralelamente aos dois processos citados (expressão de LTP e marcação da *tag*), sendo que estas somente são sintetizadas em casos nos quais o estímulo é forte o suficiente (Figura 4A). Se for, as PRPs serão capturadas apenas pelas sinapses marcadas pela *tag*, propiciando a estas sinapses um estado potenciado e a formação da LTP tardia (MONCADA et al., 2011; BALLARINI et al., 2009; REDONDO; MORRIS, 2011). Na ausência das PRPs, isto é, nos casos onde o estímulo é fraco, a sinapse marcada gradualmente retorna ao seu estado não marcado (Figura 4B) (REDONDO E MORRIS, 2011). Estudos mais recentes demonstraram que a novidade é um estímulo forte, que promove a expressão de PRPs, e, quando associado a um estímulo fraco, incapaz de promover a formação de uma nova memória por si só, este pode compartilhar suas PRPs, permitindo o aprendizado de ambos os estímulos (Figura 4C) (MONCADA; VIOLA, 2007). Alguns estudos utilizaram com sucesso a exposição à novidade (a um ambiente novo) para promover a extinção das memórias de medo e aversiva e verificaram

que este processo é dependente de síntese de proteína e marcação e captura sináptica no hipocampo nas duas situações (MYSKIW et al., 2013; MENEZES et al., 2015).

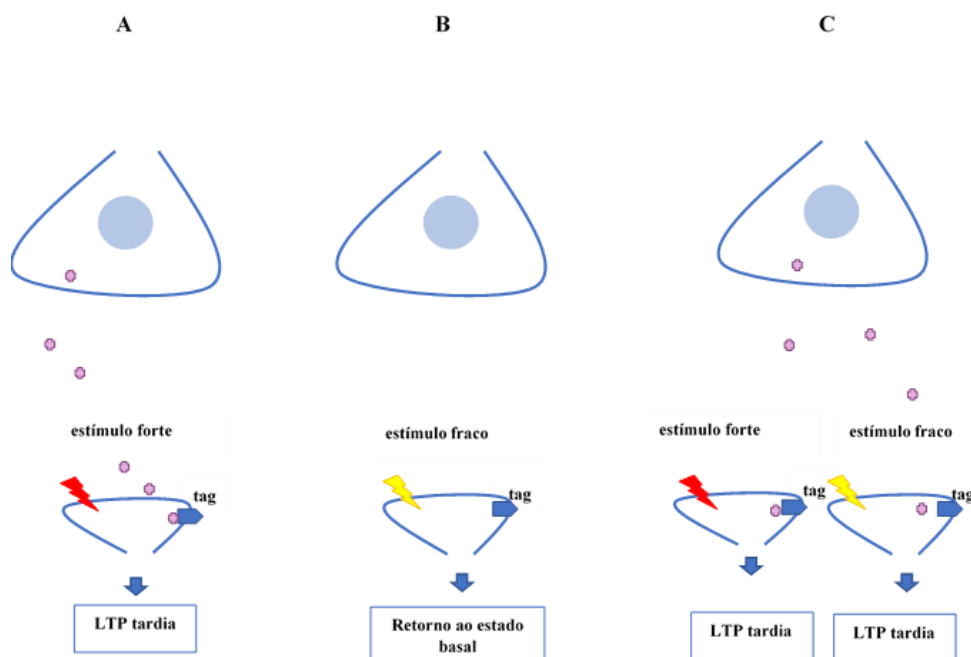


Fig. 4 - Desenho representativo da hipótese de marcação e captura sináptica. A. Um estímulo forte é capaz de gerar dois eventos dissociáveis: síntese de PRPs – proteínas relacionadas a plasticidade no núcleo e uma tag – marcação sináptica. As PRPs são capturadas pelas sinapses marcadas, levando a manutenção da LTP tardia; B. as sinapses que receberam estímulo fraco são marcadas, mas não como o estímulo não é capaz de induzir síntese de novas proteínas, não recebem PRPs, o que impede a LTP tardia e alterações duradouras nas sinapses, assim, gradualmente as sinapses retornarão ao seu estado basal; C. sinapses que receberam estímulo fraco, mas que tenham acesso aos PRPs também conseguirão manter a LTP tardia. Fonte: Autoria própria (2019).

Um dos neurotransmissores que desempenha um papel fundamental no estabelecimento duradouro da LTP no hipocampo é a dopamina (DA) (FREY et al, 1990). A dopamina pertence a um grupo de neurotransmissores, as catecolaminas, caracterizadas como importantes neurotransmissores do SNC de mamíferos, participando da regulação de diversas funções, a citar: emoções, comportamento motor e comunicação endócrina (TRUJILLO et al., 2000).

A síntese da dopamina ocorre a partir da tirosina (um precursor aromático), cuja principal fonte é a dieta (BEN-JONATHAN & HNASKO, 2001). Para que a tirosina possa realizar a sua conversão em dopamina é necessário a ação enzimática da tirosina hidroxilase (TH) e do aminoácido aromático descarboxilase (DCC), que catalisam a formação da dihidroxifenilalanina (LDOPA) e da dopamina (BOULTON & EISENHOFER, 1998; BEN-JONATHAN & HNASKO, 2001). Cerca de 80% do conteúdo dopaminérgico e conexões (que predominantemente são localizados em núcleos do tronco cerebral, onde é sintetizada) se projeta

para vias axonais como o hipocampo, a área tegmental ventral (VTA, do inglês *ventral tegmental area*), o núcleo *accumbens*, a amígdala, a substância negra, o estriado, o córtex frontal, dentre outras regiões (Figura 5) (ANDEN et al 1964; VALLONE et al., 2000; FIORENZA, 2012). Através das conexões do hipocampo com o núcleo *accumbens*, que modula diretamente a atividade da VTA através do globo pálido, é estabelecido uma alça ativa que regula a entrada da informação na MLD (LISMAN & GRACE, 2005).

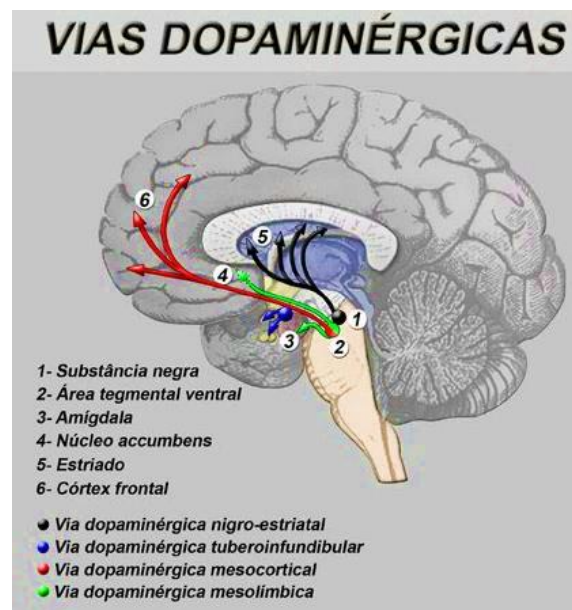


Fig. 5 – Desenho representativo das vias dopaminérgicas em cérebro humano. Fonte: Margaretta Mills (2018).

Após sintetizada, a DA é armazenada em vesículas nos terminais sinápticos de neurônios dopaminérgicos, e, a partir de um estímulo neural, é liberada na fenda sináptica por exocitose (LOPES et al., 2003). Para promover seus efeitos bioquímicos e moleculares, que são dependentes do tipo de receptor e podem incluir eventos como a ativação da adenilato ciclase, segundos mensageiros e elevação intracelular das concentrações de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), a DA liga-se aos seus receptores (proteínas transmembrana) que estão acoplados a proteína G nos terminais pós-sinápticos: receptores da família D1 (subdivididos em D1 e D5) e receptores da família D2 (subdivididos em D2, D3 e D4) (ANDEN, 1964). Posto isto, é notório que as diversas funções da DA são mediadas pela sua capacidade em ligar-se e ativar estes receptores, para então exercer seus efeitos; assim, alterações nestes receptores podem afetar a expressão dos mesmos e a transdução de sinal, acarretando muitas vezes no envolvimento de possíveis transtornos psiquiátricos (OPMMER et al., 2000; PARK et al., 2005). O bloqueio destes receptores em pesquisas sobre estudos de processos mnemônicos mostrou que a

administração de fármacos antagonistas, que bloqueiam estes receptores prejudicou a formação da memória de extinção. Rossato e colaboradores (2009), realizaram uma infusão hipocampal em ratos do antagonista dos receptores D1 (SCH 23390) após a exposição a um evento nocivo. Eles observaram que a memória de medo de longa duração desapareceu rapidamente após a infusão dessa droga (ROSSATO et al., 2009), demonstrando a importância deste neurotransmissor e desta família de receptores neste processo mnemônico.

2. JUSTIFICATIVA

O Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT) é definido como um conjunto de reações emocionais e comportamentais que se encontram associadas à memória da experiência traumática (MARGIS et al. 2003). O indivíduo com TEPT pode apresentar vivência persistente e intensa das memórias traumáticas, sofrimento psicológico e fisiológico, simbolizando aspectos do evento traumático, além de comportamento de esquiva persistente, sintomas contínuos de excitabilidade aumentada e prejuízo ocupacional em outras áreas importantes de sua vida (GUIMARO et al., 2013).

Considerando o impacto negativo que o TEPT acarreta na vida psicossocial do indivíduo, é de suma importância estudos que viabilizem a intervenção clínica destes sujeitos (MARGIS et al. 2003). Uma das estratégias utilizadas atualmente na terapêutica dessa fobia é a extinção, através da terapia de exposição (IZQUIERDO, 2002). A extinção promove a desvinculação de um estímulo condicionado do estímulo incondicionado com o qual tinha se associado para gerar uma resposta aprendida (IZQUIERDO, 2006). Os mecanismos da extinção são semelhantes aos da formação de memórias, mas, em vez de resultar em um aumento das respostas aprendidas, resultam na diminuição da probabilidade de sua expressão; assim, na extinção, o que se extingue não é a memória em si, senão a probabilidade de sua evocação (MYSKIW et al., 2013). Neste sentido é que a extinção tem uma aplicação terapêutica importante no tratamento das fobias e do TEPT, para o qual é o tratamento de escolha.

No entanto, apesar de frequentemente utilizada, a eficácia da extinção no processo terapêutico não é a ideal. Como mencionado anteriormente, o paciente pode apresentar recuperação espontânea após a terapia de exposição, pois os efeitos são pouco duráveis; ou, ainda, há a necessidade de várias sessões para se obter o resultado esperado (RESCORLA, 2004). Assim, buscar formas de otimizar a extinção terapêutica da memória é importante. Um dos meios que vêm sendo estudado para facilitar a extinção das memórias de medo e aversivas é a exposição à novidade. Estudos recentes do nosso e de outros grupos mostraram que a exposição a uma novidade (ambiente novo) facilita a extinção de memórias aversivas (MENEZES et al, 2015; MYSKIW et al, 2013). Esse efeito provavelmente se baseia na marcação e captura sináptica, já que se mostrou dependente de síntese proteica, e envolve a ativação dos receptores dopaminérgicos do tipo D1 do hipocampo (MENEZES et al, 2015). No entanto, os resultados atualmente disponíveis em estudos que avaliam o efeito da exposição à novidade na facilitação

da extinção das memórias de medo avaliam esse efeito até em torno das primeiras 24 horas após a extinção, e, na prática clínica, para o paciente, é importante garantir um efeito prolongado. Portanto, neste trabalho buscamos estudar a persistência da extinção das memórias aversivas diante exposição à novidade, bem como elucidar o papel da dopamina nos efeitos da exposição à novidade, a fim de promover uma melhor compreensão deste fenômeno. Dessa forma, hipotetizamos que nossos futuros resultados poderão contribuir para o desenvolvimento futuro de tratamentos para o TEPT e outras patologias semelhantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo geral avaliar a persistência da extinção da memória aversiva facilitada pela exposição à novidade, bem como elucidar o papel da dopamina no efeito modulatório da novidade sobre a extinção da memória em ratos.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho incluíram:

- Verificar os efeitos da exposição à novidade na extinção da memória aversiva;
- Verificar a persistência dos efeitos da exposição à novidade na extinção da memória aversiva;
- Comparar os efeitos da exposição a um ambiente novo e a um ambiente familiar na extinção da memória aversiva;
- Verificar se a administração intrahipocampal de dopamina exógena mimetiza os efeitos da exposição à novidade na extinção da memória aversiva;
- Verificar se as intervenções utilizadas (exposição à novidade, exposição a um ambiente familiar e infusão intrahipocampal de dopamina) alteram o comportamento exploratório ou locomotor ou geram comportamento tipo ansioso nos animais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra

Ratos Wistar machos (3 meses de idade; 290-330 g) foram obtidos do Biotério da Universidade Federal de Santa Maria – RS/Brasil. Os animais foram alojados em caixas plásticas especiais forradas com maravalha, com capacidade para 4 animais, em condições controladas de luz (ciclo claro/escuro 12 horas: luz a partir das 7 horas e escuro a partir das 19 horas), temperatura (21 a 23°C) e umidade (50 ± 10%), recebendo água e ração *ad libitum*. As caixas plásticas de alojamento foram limpas e trocadas a cada dois dias e todos os testes e tarefas comportamentais foram realizadas durante a fase clara do ciclo dos animais.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os “Princípios de cuidados com animais de laboratório” (NIH publicação nº 80-23, revisada em 1996) e com o CONCEA (art. 5º, incisos I e IV, da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008) sendo aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal do Pampa (protocolo 018/2017, ANEXO A).

Para o estudo, os animais foram divididos em cinco grupos:

- a) Controle (C; n = 7): Os animais foram treinados no aparato de EI (Esquiva Inibitória) e 24 horas mais tarde foram submetidos a 3 (três) sessões de extinção com intervalos de 90 min entre as sessões. Vinte e quatro horas depois, estes animais passaram pela primeira sessão de retenção (teste para medir a retenção da memória de extinção), que ocorreu também 3, 7, 14 e 21 dias após a última sessão de extinção (Figura 6).
- b) Novidade (ambiente novo) (N; n = 7): Os animais foram treinados na EI, e, 30 min antes da primeira sessão de extinção, foram expostos à novidade (ambiente novo – campo aberto nunca antes explorado) por 5 minutos; posteriormente passaram pelas sessões de extinção (3 sessões) e testes de retenção no dia 1, 3, 7, 14 e 21 após a extinção (Figura 6).
- c) Ambiente Familiar (AF; n = 7): Os animais foram expostos ao campo aberto 24 horas antes do treino na EI, para que este ambiente passasse a ser familiar ao animal. No dia seguinte, os animais desse grupo passaram pelo treino na EI, e, 30 min antes da primeira sessão de extinção (que ocorreu 24 após o treino), eles foram novamente expostos ao campo aberto (já familiar) durante 5 min, afim de isolar o efeito da

exposição ao campo aberto do efeito da exposição à novidade. Posteriormente, seguiu-se as sessões de extinção e retenção, como nos demais grupos (Figura 6).

- d) Dopamina (D; n = 7): Os animais foram treinados na EI, e, 30 min antes da primeira sessão de extinção receberam uma microinjeção intrahipocampal de dopamina exógena e posteriormente passaram pelas sessões de extinção (3 sessões) e retenção no 1º, 3º, 7º, 14º e 21º dia após a extinção (Figura 6).
- e) Ambiente Familiar + Dopamina (AF+D; n = 7): Da mesma forma que o grupo familiar, os animais foram expostos 24 horas antes da primeira sessão de treino na EI ao campo aberto. No dia seguinte, os animais desse grupo passaram pelo treino na EI, e, 30 min antes da primeira sessão de extinção (que ocorreu 24 após o treino), eles foram novamente expostos ao campo aberto (já familiar) durante 5 min e imediatamente após receberam uma microinjeção intrahipocampal de dopamina exógena. Posteriormente, seguiram-se as sessões de extinção e retenção (Figura 6).

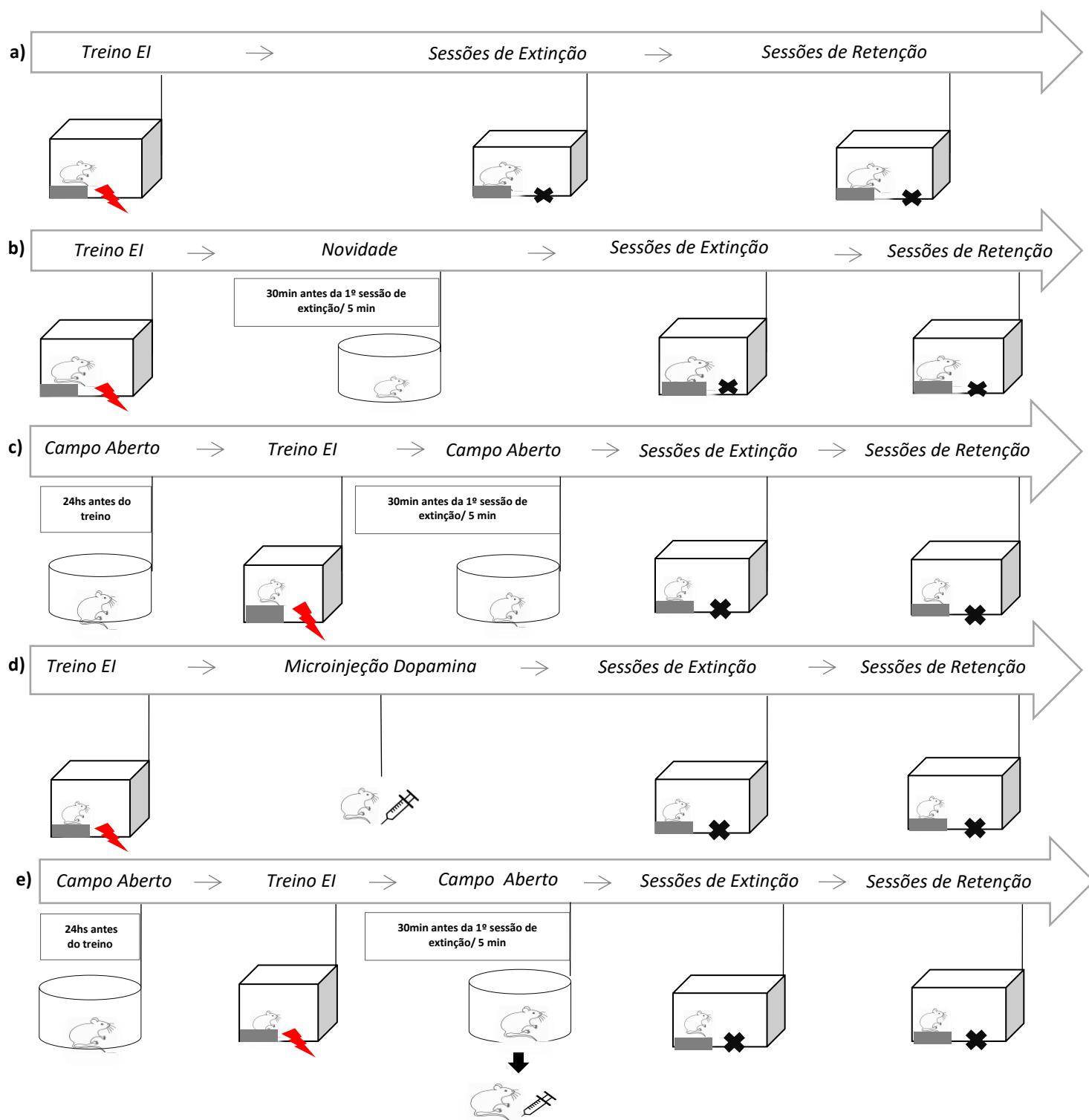


Fig. 6. Delineamento experimental. Ratos machos Wistar foram divididos em 5 grupos de acordo com a intervenção utilizada. Os animais foram treinados na esquiwa inibitória (EI), uma tarefa comportamental aversiva, e 24 horas depois foram submetidos a três sessões de treinamento de extinção com intervalo de 90 min entre as sessões. Vinte e quatro horas, 3, 7, 14 e 21 dias após os animais foram submetidos a testes de retenção. Adicionalmente, exceto pelos animais do grupo controle, de acordo com o grupo experimental, 30 minutos antes da primeira sessão de extinção os animais foram expostos a uma novidade (campo aberto desconhecido por 5 min), a um ambiente familiar (campo aberta já conhecido por 5 min), e/ou receberam uma microinjeção intra-hipocampal de dopamina. Fonte: Autoria própria (2019).

4.2 Procedimentos cirúrgicos

Considerando que um dos objetivos do estudo era comparar os efeitos da infusão intrahipocampal de dopamina na região CA1 do hipocampo, todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas-guia de calibre 27 gauge (G) (Figura 7). Para tal os animais foram anestesiados com Cetamina e Xilazina (i.p., 100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente). As cânulas-guia foram fixadas a partir das coordenadas segundo o Atlas de Watson e Paxinos (A -4,2, L $\pm$ 3,0, V - 2,0 mm) (Paxinos & Watson, 1986).



Figura 7. Imagem do aparato estereotáxico. Na foto menor o animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica, cânulas sendo implantadas na região CA1 do hipocampo. Fonte: autoria própria (2019).

A colocação das cânulas foi verificada *post-mortem*: 2-4 h após o último teste comportamental uma solução de azul de metileno a 4% foi infundida no mesmo volume usado nos experimentos, e a extensão de difusão do corante foi verificada 30 min depois e tomada como uma indicação da presumível difusão do veículo ou droga anteriormente administrada a cada animal. Apenas os dados de animais com implantes corretos e sem propagação significativa do corante no tecido e estruturas adjacentes foram analisados (MELLO-CARPES & IZQUIERDO, 2013).

4.3 Manipulação dos animais

Para que os animais pudessem se familiarizar com o pesquisador e assim evitar estresse e ansiedade no decorrer dos experimentos, após 5 dias de recuperação da cirurgia estereotáxica realizamos três sessões de manipulação dos ratos. Para isso, os animais foram retirados individualmente de suas caixas moradia e manipulados por 10 minutos. A manipulação inclui: trazer o animal próximo ao experimentador para que o odor do mesmo seja familiar ao animal e toque leve na barriga do animal para acalmá-lo. Após as sessões de manipulação, iniciou-se o protocolo experimental propriamente dito.

4.4 Condicionamento na Esquiva Inibitória

Para formar a memória aversiva nos animais, foi utilizado o aparato chamado Esquiva Inibitória (EI). Ele permite examinar de forma experimental os mecanismos envolvidos na aquisição, armazenamento e expressão de memórias emocionais associadas com eventos estressantes, intimidadores ou atemorizantes (PORTO, 2006). O aparato de EI consiste em uma caixa de 50,0 x 25,0 x 50,0 cm, com a parte frontal feita de acrílico (Figura 8). O assoalho do aparelho é formado por barras de bronze paralelas eletrificáveis e há uma plataforma elevada no canto da caixa.

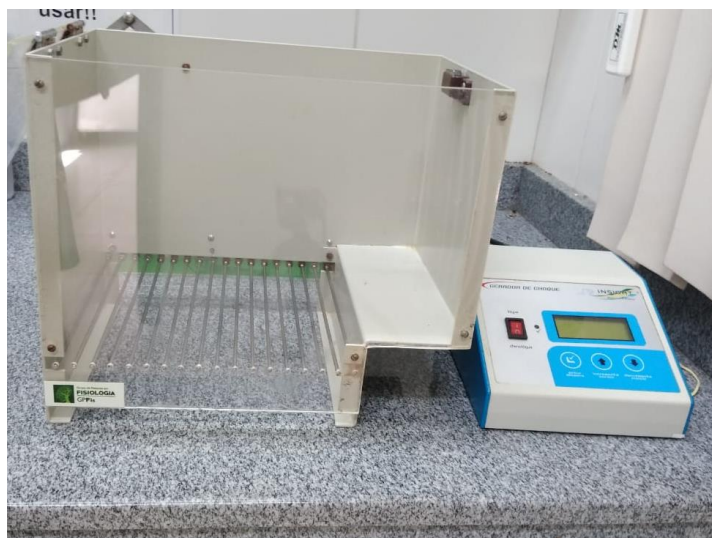


Fig. 8. Esquiva inibitória (EI). Fonte: Autoria própria (2019).

Inicialmente os animais foram treinados na EI, quando foram cuidadosamente colocados sobre a plataforma elevada e, ao descenderem com as quatro patas no assoalho de bronze eletrificável, receberam um choque elétrico de 0,5 mA por 2s (Figura 9A; CAMMAROTA et al.,

2003), sendo imediatamente recolocados nas suas caixa-moradia. A latência de descida da plataforma elevada foi mensurada através de um cronômetro. Todas as etapas da tarefa de condicionamento na EI foi realizada pelo mesmo experimentador.

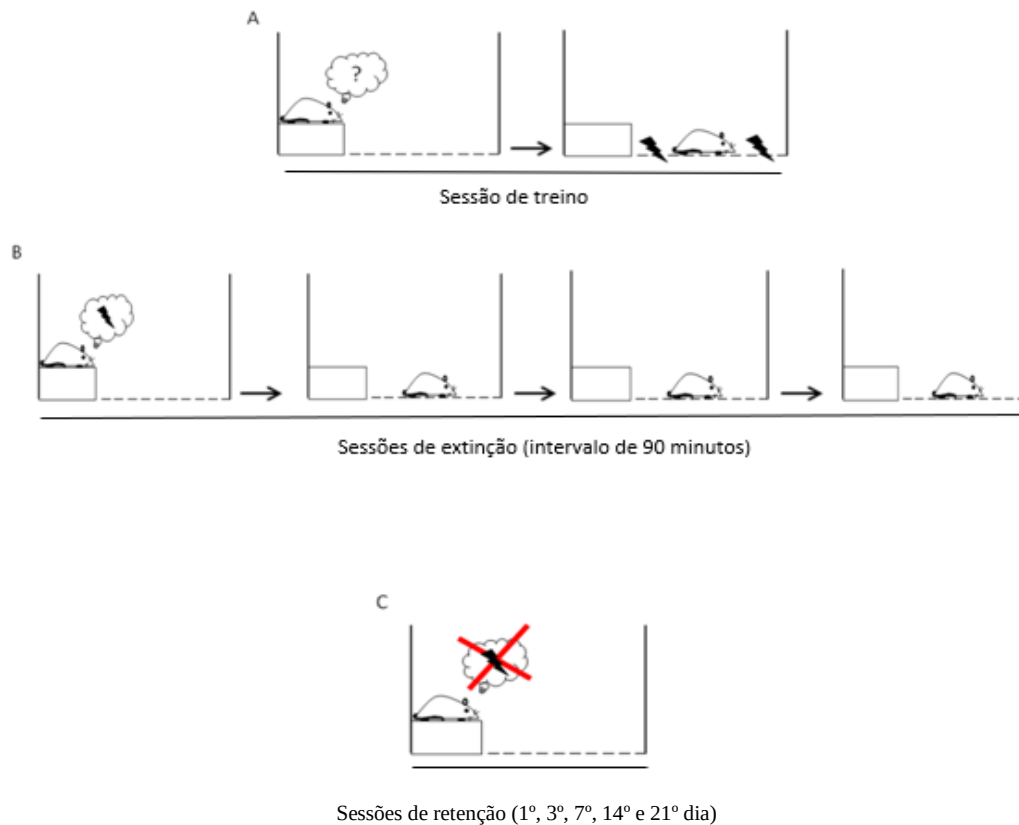


Figura 9. Esquema representativo do protocolo de condicionamento (A), extinção (B) e testes de retenção (C) na Esquiva Inibitória. (A) Condicionamento: individualmente os animais foram colocados na plataforma elevada, ao descer e encostar as quatro patas nas barras eletrificáveis, receberam um choque de 0,5 mA por 2s. (B) Extinção: vinte e quatro horas após o treino, os animais foram novamente colocados na plataforma elevada e, ao descerem não receberam mais o choque. A sessão de extinção foi repetida 3 vezes com intervalos de 90 minutos (24-27 horas depois do condicionamento na EI). (C) Testes de Retenção: vinte e quatro horas mais tarde (3º dia) iniciou-se a primeira sessão de retenção que ocorreu também no 1º, 3, 7, 14 e 21 dias após a primeira sessão de teste. Durante as sessões de condicionamento, extinção e testes foram cronometradas as latências de descida da plataforma elevada como medida de memória. Fonte: Adaptado de Mello-Carpes et al. (2013).

4.5 Treino de Extinção

No dia seguinte ao treino de condicionamento na EI (24 horas após) iniciamos as sessões de extinção. Nas sessões de extinção os animais foram novamente colocados na plataforma elevada, porém ao descer não mais receberam o choque nas patas e puderam explorar livremente todo o aparato durante 300 segundos (figura 9B). A sessão de extinção foi repetida 3 vezes com intervalos de 90 minutos entre cada uma delas (24-27 horas depois do condicionamento na EI) (CAMMAROTA et al., 2003). A cada sessão de extinção foram cronometradas as latências de descida da plataforma elevada.

4.6 Testes de retenção e persistência da memória

Vinte e quatro horas depois das sessões de extinção (3º dia) realizamos um teste de retenção da memória, com o objetivo de verificar qual memória prevalecia (do condicionamento, ou da extinção). Testes de persistência da memória também foram realizados 3, 7, 14 e 21 dias após o protocolo de extinção.

Nas sessões de retenção os animais foram novamente colocados na plataforma elevada, sendo verificada a latência de descida da plataforma (pela observação do experimentador) como medida de memória (Figura 9C) (BEVILAQUA et al., 2003; CAMMAROTA et al., 2003). Em cada teste, ao descer da plataforma o animal era rapidamente retirado do aparato e devolvido à sua caixa moradia. No intervalo dos testes entre cada animal o aparato foi limpo com álcool 70%, para evitar pistas odoríferas.

4.7 Exposição à novidade (Campo aberto)

Trinta minutos antes da primeira sessão de extinção, os animais do grupo (*n*) foram expostos a um ambiente novo. Neste estudo utilizamos como novidade o aparato de Campo Aberto (CA) (MENEZES et al., 2015). O aparato de CA é formado por uma caixa de 50 × 50 × 60 cm de madeira, pintada de branco, com uma parede de vidro frontal (Figura 10). Os animais foram cuidadosamente retirados de suas caixa-moradia, individualmente, e colocados no centro aparato, quando puderam explorar o ambiente livremente por 5 minutos. Passados 5 minutos, os

animais foram recolocados em suas caixa-moradia. No intervalo de cada animal, o aparato foi limpo com álcool 70%, para evitar pistas odoríferas.



Fig. 10. Campo Aberto (CA). No detalhe, animal explorando o CA. Fonte: Autoria própria (2019).

4.8 Exposição ao ambiente familiar (OF)

Os animais dos grupos (*f*) e (*df*) foram expostos um dia antes do treino na Esquiva Inibitória ao mesmo CA descrito anteriormente (Figura 10), para que esse ambiente se tornasse familiar para os animais. No dia seguinte, os animais dos grupos foram submetidos aos protocolos padrão de condicionamento na EI e, no dia seguinte, 30 min antes da primeira sessão de extinção, eles foram expostos ao CA já familiar por 5 min. Posteriormente, seguiram-se as sessões de extinção e retenção, conforme descrito posteriormente. Estes procedimentos foram adotados a fim de isolar o efeito da exposição à novidade/ambiente novo e o efeito do CA *per se*.

4.9 Drogas e injeção intrahipocampal

A dopamina utilizada foi adquirida da Sigma Aldrich Brasil, dissolvida em solução de 2% em soro fisiológico (vol/vol) e armazenada a -20°C protegida da luz (GARRIDO ZIN et al., 2016).

A microinfusão hipocampal ocorreu 7 dias após a realização da cirurgia. Durante a microinjeção os animais foram imobilizados e as cânulas-guia limpas com uma linha odontológica (K-FILE Colorinox® A012D, Dentsply Ind. Com. Ltda., Brasil) ajustada para o tamanho das cânulas. Após a limpeza e desobstrução, as agulhas de injeção (agulhas gengivais de 0,3 mm de diâmetro) foram conectadas a uma microseringa Hamilton (10 µl) e foram inseridas dentro de cada cânula, posicionadas 1,3 mm ou 3,2 mm abaixo das cânulas. A infusão de droga

ou veículo foi realizadas na região CA1 dorsal do hipocampo em ambos os lados. No momento da entrega do fármaco, as cânulas de infusão de calibre 30 estavam firmemente encaixadas nas guias.

Os animais dos grupos *iv* e *v* receberam infusões de dopamina (dose de 1 µg/µl; 1 µl/lado na região CA1 do hipocampo) realizadas ao longo de 60 s com uma bomba de infusão, sendo as agulhas de infusão deixadas no local das cânulas por mais 60 segundos após a infusão para minimizar possível refluxo (GARRIDO ZIN et al., 2016). Já os animais dos grupos (*c*), (*n*), e (*f*) receberam infusões do mesmo volume de veículo (solução salina).

4.10 Experimentos comportamentais de controle

Para garantir que os resultados verificados na tarefa de EI devem-se a efeitos das intervenções (novidade, infusão de dopamina) na função mnemônica, e não na ansiedade, comportamento locomotor e/ou sensibilidade álgica do animal, cerca de 2 a 3 horas antes de cada teste de retenção, os animais foram submetidos à tarefas de controle comportamental: teste do labirinto em cruz elevado, campo aberto e placa quente.

4.10.1 Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um método simples utilizado para avaliar as respostas tipo ansiedade em roedores (PELLOW et al., 1985). Este aparelho está na configuração de uma cruz e compreende dois braços abertos (25 x 5 x 0,5 cm) um em frente ao outro, perpendiculares à dois braços fechados (25 x 5 x 16 cm); entre os braços localiza-se o centro do aparato (5 x 5 x 0,5 cm) (Figura 11). O equipamento possui sensores infravermelhos que monitoram a movimentação do animal. Os braços abertos não possuem paredes enquanto que os braços fechados têm uma parede alta (16 cm).



Fig. 11. Labirinto em cruz elevado (LCE). Aparato utilizado para análise do comportamento tipo ansiedade dos animais. Fonte: Autoria própria (2019).

No dia do teste os animais foram retirados de sua caixa-moradia, e individualmente colocados no centro do LCE, onde permaneceram por 5 minutos para explorar o aparato livremente. Foi registrado o tempo permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Neste teste, quanto mais ansioso estiver o animal, maior o tempo de permanência nos braços fechados e o número de entradas nestes braços (PELLOW et al., 1985).

4.10.2 Campo aberto (CA)

A fim de verificar a atividade exploratória e locomotora dos animais, foi utilizado o aparato de Campo Aberto (CA), que consiste em uma caixa de madeira branca $50 \times 50 \times 60$ cm com uma parede de vidro frontal e assoalho dividido em quadrantes (Figura 10). No dia do teste os animais foram colocados no canto direito do aparato e foi registrado o número de cruzamentos e elevações realizadas pelo animal ao longo de 5 minutos (SIMON et al 1994).

4.10.3 Teste da placa quente

Para assegurar que os animais estavam com a sensibilidade álgica preservada, o qual é necessária para o aprendizado na EI, foi utilizado o aparelho *Hot Plate* para realização do teste da placa quente. O aparelho é formado no assoalho por uma placa de metal e paredes de acrílico de 20 cm ao redor (Figura 13).



Figura 12. Placa quente (PQ). Aparato utilizado para análise da sensibilidade álgica dos animais. Fonte: Autoria própria (2019).

No dia do teste os animais foram cuidadosamente colocados no centro da placa de metal, que já se encontrava aquecida a uma temperatura de 54°C, e registrou-se através da observação do experimentador o tempo que animal demorou para expressar uma resposta ao calor (lamber, morder, saltar ou levantar as patas). Se o animal apresenta resposta em até 30 segundos consideramos que sensibilidade álgica está preservada (WOOLFE & MC DONALD 1944). O tempo máximo permitido para permanência dos animais na superfície quente é 30 segundos (tempo de corte) para evitar lesões nas patas (SILVA et al., 2018).

4.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software PrismGraph 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). Para os resultados da EI, um limite de 300 segundos foi imposto nas latências durante os testes de retenção (latências iguais ou superiores a 300 s foram contadas como 300 s). Portanto, essa variável não seguiu uma distribuição normal, de modo que os dados de EI foram expressos como medianas $\pm$ intervalo interquartil. As comparações entre os grupos nas diferentes sessões (condicionamento, extinção e testes de retenção) foram realizadas usando ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida pelo *post-hoc* de Dunn. Comparações intra-grupo, entre a latência de treino e teste, foram realizadas

utilizando o teste de Wilcoxon. Os resultados dos testes LCE, CA e placa quente apresentaram uma distribuição normal, sendo expressos em média $\pm$ DP e analisados por ANOVA paramétrica. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando encontrado $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 A exposição à novidade promove a extinção da memória aversiva; este efeito não ocorre quando os animais são expostos a um ambiente familiar

Os animais foram treinados em EI e 24hs após o treinamento foram submetidos a três sessões de extinção com intervalos de 90 min entre as sessões. Vinte e quatro horas após a última sessão de extinção, foram submetidos à primeira sessão de retenção, e no 3º, 7º, 14º e 21º dia à sessões de persistência da memória. Trinta minutos antes da primeira sessão de extinção, os animais do grupo (*n*) foram expostos a uma novidade (CA) e posteriormente realizaram as sessões de extinção e retenção normalmente. Os animais do grupo (*f*) foram expostos a um CA familiar e posteriormente realizaram as sessões de extinção e retenção normalmente.

Durante o condicionamento na EI, todos os animais apresentaram latência similar quando comparados entre si ($P > 0,05$; Figura 13). Na comparação entre as latências de descida da plataforma no treino e na exposição seguinte à EI (primeira sessão de extinção) observamos que os animais de todos os grupos foram capazes de aprender na tarefa de EI, já que houve aumento das latências ($W = 45$, $P = 0,003$ para grupo controle; $W = 28$, $P = 0,01$ para grupo novidade; $W = 28$, $P = 0,01$ para grupo familiar; Figura 13).

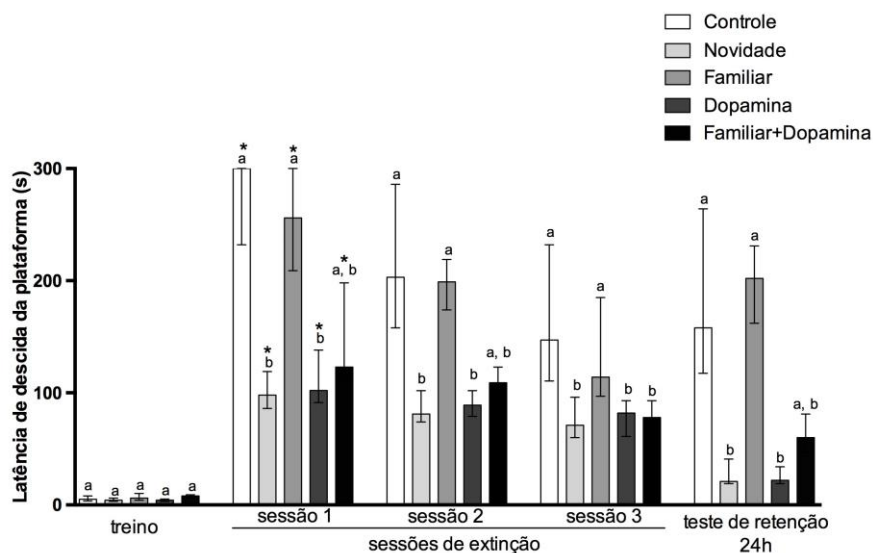


Figura 13. A exposição à novidade (ambiente novo) promove a extinção da memória aversiva; este efeito não ocorre quando os animais são expostos a um ambiente familiar e a infusão de dopamina mimetiza os efeitos da novidade. Latências de descida da plataforma da EI na sessão de condicionamento (treino), nas 3 sessões de extinção e no teste de retenção (24h). Em cada sessão, letras diferentes significam grupos diferentes entre si ($P < 0,05$; Kruskal-Wallis seguido de pos-hoc de Dunn). * $P < 0,05$ em relação ao treino (teste de Wilcoxon; treino vs. teste). Fonte: Autoria própria (2019).

No entanto, quando observamos a latência da primeira, segunda e terceira sessões de extinção, há diferenças entre os grupos ($H_{(5)} = 22,76$, $P = 0,0001$ para a sessão 1; $H_{(5)} = 21,00$, $P = 0,0003$ para a sessão 2; $H_{(5)} = 21,52$, $P = 0,0002$ para a sessão 3, fig. 13). O grupo (*n*) (novidade) apresentou latências significativamente menores em relação ao controle ($P < 0,001$ para a sessão 1; $P < 0,01$ para a sessão 2; $P < 0,01$ para a sessão 3; Figura 14), indicando que a exposição a um novo ambiente facilita a aprendizagem da extinção. Por outro lado, o grupo (*f*) (familiar) não apresentou diferenças em relação ao grupo controle (*c*) ($P > 0,05$ em todas as sessões de extinção; fig.13) e apresentou diferenças quando comparado ao grupo (*n*) ($P < 0,05$ para a sessão 1; $P < 0,01$ para a sessão 2; $P < 0,05$ para a sessão 3; Fig. 13), indicando que a exposição a um ambiente familiar não promove a aprendizagem da extinção.

5.2 A infusão de dopamina mimetiza os efeitos da novidade

Os ratos do grupo (*d*) foram treinados na EI e 30 min antes da primeira sessão de extinção receberam uma microinjeção hipocampal de dopamina (dose de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 1 μl /lado na região CA1 do hipocampo). Posteriormente, foram submetidos a sessões de extinção e retenção. Na comparação entre as latências de descida da plataforma no treino e na exposição seguinte à EI (primeira sessão de extinção) observamos que os animais do grupo (*d*) foram capazes de aprender na tarefa de EI, já que houve aumento da latência ($W = 28$, $P = 0,01$; Figura 14).

Os animais que receberam dopamina hipocampal apresentaram latência significativamente menor nas sessões de extinção em comparação com o grupo controle (*c*) ($P < 0,05$ para todas as sessões; figura 14). Da mesma forma, não há diferenças na latência de dos grupos dopamina e novidade ($P > 0,05$ para todas as sessões; figura 14). Estes dados sugerem que a dopamina mimetiza os efeitos da novidade, promovendo a aprendizagem da extinção.

No teste de retenção realizado 24 horas após a extinção, a latência do grupo (*d*) foi significativamente menor do que a dos grupos controle (*c*) e familiar (*f*) ($P < 0,01$ para ambos; figura 14), indicando que a dopamina promoveu a extinção da memória aversiva da EI. Por outro lado, o grupo (*d*) (dopamina) apresentou latência similar ao grupo (*n*) (novidade) ($P > 0,05$; figura 14), sugerindo que a dopamina mimetiza os efeitos da novidade na extinção da memória.

Adicionalmente, um grupo de animais foi exposto ao CA familiar (conforme relatado acima um estímulo familiar não é capaz de gerar extinção da memória) e também recebeu microinfusão intrahipocampal de dopamina (dose de 0.01 μ L /ml, 1 μ L por lado na região CA1 do hipocampo dorsal). Os animais deste grupo apresentaram latência significativamente menor do que a dos animais controle (grupo *(c)*) em todas as sessões de extinção ($P > 0,05$ para todas as sessões; figura 14) e no teste de retenção realizado 24h após a extinção ($P > 0,05$; figura 14). Este conjunto de dados demonstra que a administração de dopamina hipocampal exerce efeitos modulatórios sobre a extinção que exposição novidade.

5.3 A exposição à novidade, bem como a infusão de dopamina, promovem a persistência da memória de extinção

Todos os animais foram submetidos a sessões de teste para medir a persistência da memória de extinção. Os testes de persistência foram realizados 3, 7, 14 e 21 dias após a última sessão de extinção. Encontramos diferenças entre os grupos em todos os dias de teste ($H_{(5)} = 24,27$, $P > 0,0001$ para teste de 3 dias; $H_{(5)} = 25,67$, $P > 0,0001$ para o teste de 7 dias; $H_{(5)} = 21,52$, $P > 0,0001$ para o teste de 14 dias; $H_{(5)} = 24,41$, $P > 0,0001$ para o teste de 21 dias; fig. 15).

Observamos que os animais do grupo *(n)* (expostos a novidade – CA novo) apresentaram latências significativamente menores que as do grupo controle *(c)* ao longo dos 21 dias ($P < 0,01$ para o teste de 3 dias; $P < 0,001$ para os 7 dias teste; $P < 0,001$ para o teste de 14 dias; $P < 0,001$ para o teste de 21 dias; figura 15). Os animais do grupo *(d)* (que receberam infusão de dopamina na região CA1 do hipocampo) também apresentaram latências significativamente menores que o grupo controle *(c)* ao longo dos 21 dias ($P < 0,01$ para o teste de 3 dias; $P < 0,01$ para teste de 7 dias; $P < 0,05$ para o teste de 14 dias; $P < 0,05$ para o teste de 21 dias; figura 15). Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle ao longo dos testes ($P > 0,05$ para todos os grupos e dias). Adicionalmente, o grupo *fd* (CA familiar + dopamina) não apresentou diferenças significativas em relação a nenhum grupo em nenhum dia de treino ($P > 0,05$ para todos os grupos e dias). Portanto, a exposição a novidade, bem como a infusão de dopamina na região CA1 do hipocampo, foram capazes de modular a extinção da memória, facilitando-a, efeito este que se mostrou persistente ao longo de 21 dias.

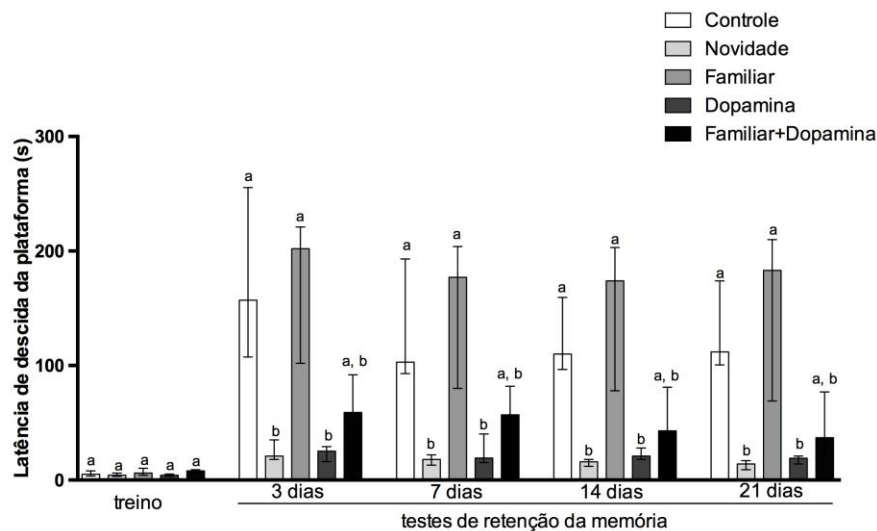


Figura 14. A exposição à novidade (ambiente novo), bem como a infusão de dopamina facilitam a extinção da memória aversiva, sendo este efeito persistente. Latências de descida da plataforma da EI na sessão de condicionamento (treino), e nos testes de persistência realizados 3, 7, 14 e 21 após a extinção. Em cada sessão, letras diferentes significam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$; Kruskal-Wallis seguido de pos-hoc de Dunn). Fonte: Autoria própria (2019).

5.4 A exposição a novidade, ao ambiente familiar, assim como a infusão de dopamina ou soro fisiológico não alteram o comportamento tipo ansiedade, nem o comportamento locomotor e exploratório e a sensibilidade algica dos animais

Os animais foram testados no LCE, CA e teste da placa quente nos mesmos dias dos testes de retenção, afim de verificar se alguma das intervenções adotadas no estudo (exposição à novidade e ao ambiente novo, infusão de dopamina ou veículo) seria capaz de alterar a atividade exploratória e locomotora, o comportamento tipo ansiedade e/ou os limiares de dor. Verificamos que nem o fármaco ou veículo injetado nos hipocampus, nem a exposição ao CA novo ou familiar, afetaram os parâmetros avaliados em nenhum dia de teste (Tabela 1).

Tabela 1. A infusão de dopamina e a exposição à novidade não afetaram a ansiedade, sensibilidade álgica e atividade locomotora dos animais nos dias do teste (1°, 3°, 7°, 14° e 21° dia). Os dados são expressos como média $\pm$ DP do número e o tempo gasto nas entradas nos braços abertos (LCE), o tempo de latência para levantar ou lambe as patas (PQ) e o número de cruzamentos e elevações (CA). Não houve diferenças significativas entre os grupos. (teste ANOVA, n = 5 animais por grupo).

Grupos		Controle	Novidade	Dopamina	Familiar	Dopamina + Familiar	Valor de p
LCE 1° dia	Total de entradas (n)	1.53 $\pm$ 0.51	1.63 $\pm$ 0.61	1.49 $\pm$ 0.56	1.06 $\pm$ 0.40	1.34 $\pm$ 0.50	p: 0,48
	Tempo nos braços abertos (s)	115.3 $\pm$ 12.65	130.6 $\pm$ 16.26	140.0 $\pm$ 19.25	127.4 $\pm$ 25.98	145.4 $\pm$ 23.18	p: 0,05
LCE 3° dia	Total de entradas (n)	7.11 $\pm$ 1.45	6.00 $\pm$ 1.15	5.14 $\pm$ 1.21	6.00 $\pm$ 1.15	6.71 $\pm$ 1.38	p: 0,05
	Tempo nos braços abertos (s)	139.4 $\pm$ 24.58	152.2 $\pm$ 25.65	146.0 $\pm$ 25.0	133.1 $\pm$ 27.87	142.1 $\pm$ 27.96	p: 0,62
LCE 7° dia	Total de entradas (n)	10.22 $\pm$ 2.10	10.57 $\pm$ 1.61	10.71 $\pm$ 1.70	11.29 $\pm$ 2.05	10.57 $\pm$ 1.51	p: 0,05
	Tempo nos braços abertos (s)	170.9 $\pm$ 30.60	155.0 $\pm$ 25.63	156.7 $\pm$ 32.05	138.1 $\pm$ 3 1.79	134.0 $\pm$ 25.32	p: 0,11
LCE 14° dia	Total de entradas (n)	9.88 $\pm$ 1.83	10.71 $\pm$ 1.97	10.0 $\pm$ 1.82	11.86 $\pm$ 1.95	11.57 $\pm$ 1.71	p: 0,16
	Tempo nos braços abertos (s)	122.9 $\pm$ 27.11	140.7 $\pm$ 31.60	153.9 $\pm$ 26.37	145.0 $\pm$ 25.68	125.1 $\pm$ 28.11	p: 0,14
LCE 21° dia	Total de entradas (n)	10.0 $\pm$ 1.41	10.29 $\pm$ 1.38	10.71 $\pm$ 1.38	10.4 3 $\pm$ 1.27	10.43 $\pm$ 1.27	p: 0,87
	Tempo nos braços abertos (s)	130.7 $\pm$ 13.28	144.1 $\pm$ 28.29	145.1 $\pm$ 23.81	138.6 $\pm$ 21.69	136.1 $\pm$ 15.18	p: 0,17
Placa quente 1° dia	Latência (s)	6.77 $\pm$ 1.78	6.85 $\pm$ 1.34	6.00 $\pm$ 2.16	6.57 $\pm$ 2.57	6.8 5 $\pm$ 2.11	p: 0,92
Placa quente 3° dia	Latência (s)	7.00 $\pm$ 2.12	6.28 $\pm$ 1.70	7.42 $\pm$ 1.90	7.00 $\pm$ 1.91	8.14 $\pm$ 2.03	p: 0,50
Placa quente 7° dia	Latência (s)	5.66 $\pm$ 1.00	7.28 $\pm$ 1.49	6.71 $\pm$ 1.79	6.57 $\pm$ 1.39	6.57 $\pm$ 1.81	p: 0,32
Placa quente 14° dia	Latência (s)	10.6 $\pm$ 2.60	9.85 $\pm$ 2.03	11.57 $\pm$ 2.57	9.00 $\pm$ 1.52	10.86 $\pm$ 2.85	p: 0,33
Placa quente 21° dia	Latência (s)	8.88 $\pm$ 2.71	9.71 $\pm$ 1.97	10.0 $\pm$ 2.0	8.85 $\pm$ 1.95	10.57 $\pm$ 1.71	p: 0,48
Campo Aberto 1° dia	Cruzamentos (n) Elevações (n)	50.33 $\pm$ 13,37 19.67 $\pm$ 4.66	43.71 $\pm$ 8.51 18.29 $\pm$ 4.49	40.14 $\pm$ 9.11 17.86 $\pm$ 3.07	53.29 $\pm$ 10.69 19.29 $\pm$ 2.62	53.86 $\pm$ 10.40 16.29 $\pm$ 3.40	p: 0,08 p: 0,46
Campo Aberto 3° dia	Cruzamentos (n) Elevações (n)	39.89 $\pm$ 5.34 16.67 $\pm$ 1.73	36.00 $\pm$ 5.56 13.43 $\pm$ 1.61	33.57 $\pm$ 4.15 14.29 $\pm$ 2.43	40.71 $\pm$ 7.58 15.00 $\pm$ 3.51	42.57 $\pm$ 7.91 13.57 $\pm$ 1.98	p: 0,06 p: 0,05
Campo Aberto 7° dia	Cruzamentos (n) Elevações (n)	31.33 $\pm$ 7.33 15.00 $\pm$ 2.06	35.29 $\pm$ 9.05 15.14 $\pm$ 1.06	34.71 $\pm$ 3.63 13.86 $\pm$ 1.06	36.71 $\pm$ 6.18 14.57 $\pm$ 1.27	37.14 $\pm$ 7.40 14.00 $\pm$ 1.41	p: 0,05 p: 0,36
Campo Aberto 14° dia	Cruzamentos (n) Elevações (n)	31.33 $\pm$ 7.33 13.11 $\pm$ 1.45	35.29 $\pm$ 9.05 13.14 $\pm$ 1.57	34.71 $\pm$ 3.63 13.00 $\pm$ 1.00	36.71 $\pm$ 6.18 12.86 $\pm$ 1.34	37.14 $\pm$ 7.40 12.00 $\pm$ 0.81	p: 0,47 p: 0,43
Campo Aberto 21° dia	Cruzamentos (n) Elevações (n)	26.11 $\pm$ 5.27 11.67 $\pm$ 1.50	30.00 $\pm$ 7.89 13.57 $\pm$ 1.71	32.57 $\pm$ 5.09 12.71 $\pm$ 1.79	35.57 $\pm$ 8.63 12.71 $\pm$ 1.89	31.00 $\pm$ 5.29 12.71 $\pm$ 1.38	p: 0,08 p: 0,27

6. DISCUSSÃO

Neste estudo confirmamos que a exposição à novidade facilita a extinção das memórias aversivas, e demonstramos pela primeira vez que este efeito modulatório é persistente (por pelo menos 21 dias). Adicionalmente, demonstramos que a infusão de dopamina na região CA1 do hipocampo mimetiza os efeitos da exposição à novidade, facilitando a extinção.

Vários estudos já apontaram o papel facilitador da exposição à novidade na modulação das memórias; dentre estes, estudos em animais têm demonstrado que a exploração de um novo ambiente promove a potenciação de longo prazo (LTP) no hipocampo, melhorando assim a codificação da memória (DAVIS et al., 2004; LI et al., 2003; SAJIKUMAR & FREY, 2004). Stroube e colaboradores (2003) mostraram que a LTP precoce (independente de síntese de proteínas) pode ser transformada em LTP tardia (dependente de síntese de proteínas) no hipocampo (principalmente no giro denteado) pela exploração precedente de um novo ambiente, e que, contrariamente, a exposição a um ambiente familiar não apresenta este efeito, isto é, apenas a exploração a um ambiente novo modula a manutenção da LTP. Evidências acerca dos efeitos da novidade também foram observadas em humanos, quando a exposição à novidade (cenas novas) no tempo de 5 minutos antecedentes a uma tarefa de recordação de palavras melhorou a aprendizagem (FENKER et al., 2008).

Recentemente, os efeitos da novidade também foram estudados na generalização do medo em estudo publicado por nosso grupo de pesquisa. Na generalização da memória o sujeito transfere o medo experimentado para condições seguras e semelhantes após um evento traumático; o referido trabalho mostrou que a exposição à novidade dificulta a generalização da memória aversiva e que este mecanismo é dependente da síntese proteica no hipocampo (VARGAS et al., 2018). De fato, o efeito novidade parece ser altamente dependente do sistema hipocampal, uma vez que em pacientes com lesões extensas no lobo temporal a novidade não apresenta efeitos (KISHIYAMA et al., 2004).

Sabe-se que alterações observadas no processo de aprendizagem e memória ocorrem devido à plasticidade neural, ou seja, à reorganização duradoura que ocorre no cérebro maduro diante da aprendizagem (RAMÓN Y CAJAL, 1911). Dito isto, modular respostas aversivas através do processo de extinção quando as mesmas já não são essenciais à sobrevivência é extremamente importante (JEFFREY & JAY, 1998). Atualmente evidência indicam que a exposição à novidade pode atuar como método facilitador no processo de extinção de memórias

aversivas, especialmente em condições de trauma (LUCAS et al., 2018). Wang e colaboradores (2016) demonstraram que a exposição à novidade por 5 minutos, 1 hora antes do treinamento de extinção pode facilitar a extinção do medo contextual. No entanto, apesar dos efeitos da novidade na modulação da memória terem sido amplamente demonstrados (MENEZES et al., 2015; WANG et al., 2016; MYSKIW et al., 2013; BALLARINI et al., 2009), a maioria dos estudos se limita a testar os efeitos da novidade em um teste único de retenção, geralmente realizado 24h após as sessões de extinção. No presente estudo nós demonstramos que este efeito é persistente (realizamos testes até 21 dias após a última sessão de extinção), portanto, a novidade tem efeitos a longo prazo na facilitação da extinção das memórias aversivas.

Acredita-se que a novidade promove um “reforço” na memória de extinção, mecanismo que pode ser sustentado pela "hipótese da marcação e captura sináptica" (STC), segundo a qual o treino de extinção produz um *tag* (marcação) nas sinapses apropriadas, enquanto a exposição à novidade, além da *tag*, promove a síntese de proteínas relacionadas à plasticidade que são capturadas por ambas as *tags*, fortalecendo as sinapses, promovendo a LTP e a plasticidade sináptica (MYSKIW et al., 2013). Esse processo ocorre porque exposição a novidade promove a ativação de neurônios dopaminérgicos da área tegmentar ventral (ATV) e substância negra (SN), o que, por sua vez, resulta na liberação de dopamina (DA) no hipocampo; este aumento na concentração de DA no hipocampo aumenta a plasticidade neural, aumentando a LTP (LI et al., 2003). De fato, nós verificamos em estudo anterior do nosso grupo que a novidade promove aumento dos níveis hipocámpais de dopamina e que seus efeitos são dependentes da ativação dos receptores D1 e seus segundos mensageiros (MENEZES et al., 2015), e aqui demonstramos que a infusão de dopamina no hipocampo mimetiza os efeitos da novidade.

Cabe destacar, também, a atuação do sistema noradrenérgico, que parece também estar envolvido nos efeitos relacionados a exposição a novidade (MONCADA, 2016) na medida em que a exploração a novos ambientes causa liberação de adrenalina e noradrenalina, principais neurotransmissores responsáveis pela atenção e vigília, resultando na estimulação e, conseqüentemente, no aumento da atividade do sistema noradrenérgico (MOSER et al., 1994 ; SARA et al., 1994 ; VANKOV et al., 1995; STRAUBE et al., 2003; STARKE, 2001). Além disso, a ativação elétrica promovida por neurônios vindos do ATV e LC na região hipocámpal induz a formação de MLDs que dependem da atividade tanto de receptores β -adrenérgicos como os dopaminérgicos do tipo D1/D5 (MONCADA, 2016).

Neste estudo destacamos o papel do sistema dopaminérgico, demonstrando que a infusão de dopamina no hipocampo dos animais experimentais mimetiza os efeitos da exposição à novidade, inclusive promovendo a persistência da extinção das memórias aversivas. O efeito persistente se dá através do controle da síntese das PRPs que desencadeiam diversos processos moleculares que resultarão na transcrição gênica e eventual processo de transdução proteica, resultando no fortalecimento do traço mnemônico (MONCADA; BALLARINI; VIOLA, 2015; MONCADA, 2016). Experimentos em fatias do hipocampo mostram que a LTP na região CA1 é fortemente dependente de dopamina (LISMAN & GRACE, 2005).

A DA liberada no hipocampo tem sido o foco central em várias teorias que estudam os mecanismos cerebrais envolvidos no processamento da novidade (LISMAN & GRACE, 2005; SURI et al., 2001; DUZEL et al., 2010). Alguns estudos observaram que a medida em que o estímulo se torna familiar os neurônios dopaminérgicos não respondem tão rapidamente quanto responderiam a novos estímulos (LYNDERBERG et al., 1992; STEINFELS et al., 1983), o que fortalece a hipótese do importante papel deste neurotransmissor para os efeitos da novidade. O envolvimento do sistema dopaminérgico na modulação da novidade também foi confirmado a partir de estudos em que se realizou o bloqueio de antagonistas dos receptores dopaminérgicos D1 e D5, através de infusões de SCH23390, ocasionando o bloqueio da memória de longa duração (WANG et al., 2010). No presente estudo, corroborando com nossos trabalhos prévios e com a literatura citada, verificamos que a infusão hipocampal de dopamina é capaz de promover os mesmos efeitos da exposição a um ambiente novo, e que um ambiente familiar não o é.

Em seus estudos, Bethus e colaboradores (2010) investigaram o papel da dopamina no processamento da MLD na região do hipocampo. Seus achados estabelecem que a infusão intrahipocampal de um antagonista dopaminérgico (SCH23390) afeta o traço mnemônico, diminuindo a persistência da memória de longa duração e que esse processamento é mediado pelo hipocampo e requer a ativação de receptores dopaminérgicos (D1 e D5) durante ou em torno da aprendizagem. Resultados semelhantes são observados em outros estudos que utilizam diferentes tarefas de aprendizagem, como reconhecimento de objetos, condicionamento de medo contextual, memória gustativa e memória espacial (WANG et al., 2010; Merhav & Rosenblum, 2008; BALLARINI et al., 2009).

Ainda que os tratamentos atuais para transtornos de fobias, como o TEPT, sejam eficientes na redução de seus efeitos danosos, a reincidência da fobia/memória aversiva após o

tratamento bem-sucedido ainda é comum, o que destaca a necessidade de intervenções que tenham um resultado mais persistente (LUCAS et al., 2018). Nesse sentido, a busca por estratégias comportamentais para melhorar a extinção e fornecer aplicações clínicas poderosas para maximizar ainda mais a eficácia dos tratamentos baseados na exposição a fim de evitar a recuperação espontânea são de suma importância (PITTIG et al., 2015; RESCORLA, 2004). Nossos achados contribuem para direcionar as pesquisas relacionadas aos mecanismos mnemônicos pertinentes aos transtornos relacionados ao medo, uma vez que demonstramos que tanto a exposição à novidade quanto a administração de dopamina modulam a extinção mnemônica, facilitando-a.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem-nos afirmar que a exposição à novidade facilita a extinção das memórias aversivas, efeito modulatório que é persistente (por pelo menos 21 dias). Adicionalmente, o sistema dopaminérgico está envolvido nos efeitos da novidade, já que a infusão de dopamina na região CA1 do hipocampo mimetiza os efeitos da exposição à novidade, facilitando a extinção e sua persistência.

Ainda, o efeito facilitador da exposição a novidade sobre a extinção das memórias aversivas não foi observado em animais expostos a um ambiente familiar, o que fortalece ainda mais nossos achados sobre o efeito facilitador da exposição a um ambiente novo (novidade).

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados encontrados neste estudo, que trazem importantes evidências com implicações significativas para a prática clínica, e da escassez na literatura acerca de tratamentos que tenham efeito persistente sobre a extinção das memórias aversivas relacionadas ao TEPT, para entender mais profundamente os mecanismos envolvidos no papel do sistema dopaminérgico na extinção da memória identificamos a necessidade de dar continuidade às nossas pesquisas neste tema. Desta forma, pretendemos verificar:

- Como a estimulação ou a inibição de núcleos dopaminérgicos que culminam no hipocampo (VTA, por exemplo) influenciaria a processo de extinção;
- Se os níveis hipocampais de BDNF (principal proteína envolvida na ativação gênica requerida na persistência das memórias) se alteram diante da exposição à novidade;
- Se outras intervenções com potencial para estimular o sistema dopaminérgico (exercício físico, por exemplo), poderiam modular o processo de extinção da memória, facilitando-o.

Estes estudos poderão ser continuados em parceria com o Grupo de Pesquisa em Fisiologia, junto ao qual este trabalho foi desenvolvido.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERINI, C. M.; LEDOUX, J. E. **Memory reconsolidation**. Current Biology, Elsevier, 2013.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Publishing; 2013.

ANDEN, N.E., CARLSSON, A., DAHLSTROEM, A., FUXE, K., HILLARP, N.A., LASSON, K. **Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons**. Life Science, 1964.

ANDRADE, A .C, BARCELOS, J.L. SILVA, J.B. **Análise comparativa da eficácia de tratamentos do transtorno do estresse pós-traumático**. Revista Amazônia Science & Health Volume 6, nº 2, 2018.

AKIRAV, I., MAROUN, M. **Stress modulation of reconsolidation**. Psychopharmacology, v. 226, Out. 2012.

AYBEK S, NICHOLSON TR, O'Daly O, ZELAYA F, KANAAN RA, DAVID AS. **Emotion-Motion Interactions in Conversion Disorder: An fMRI Study**. PLoS ONE 10(4): e0123273. 2015

BALLARINI, F., MONCADA D., MARTINEZ, M.C., ALEN N. e VIOLA H. **A marcação comportamental é um mecanismo geral de formação de memória de longo prazo** . *Proc. Natl Acad. Sci. EUA* **106**, 14 599-14 604, 2009.

BARLOW, H.D. **Manual clínico dos transtornos psicológicos: tratamento passo a passo**. São Paulo, SP. Artmed, 2016.

BEAR, M. F. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

BEAR, M. F., COOPER, L. N. **Molecular mechanisms for synaptic modification in the visual cortex: interaction between theory and experiment**. In GLUCK, M.A. RUMELHART, D.E. **Neuroscience and connectionist theory**. 1990. Disponível em: <https://books.google.com.br/bemooks?hl=ptBR&lr=&id=TXt6ZVMSz8sC&oi=fnd&pg=PR3&dq=Neuroscience+and+Conne#v=onepage&q=Neuroscience%20and%20Conne&f=false>. Acesso em 17/12/18.

BEN-JONATHAN, N.; HNASKO, R. **Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor**. Endocrine Reviews, 22(6): 724 – 763, 2001.

BETHUS, I., DOROTHY, T., MORRIS, G.M.R. **Dopamine and memory: modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA receptor-dependent paired associates**. The Journal Neuroscience, UK, 2010.

BEVILAQUA, L. R. et al. **The entorhinal cortex plays a role in extinction**. Neurobiol. Learn. Mem., 2006.

BEVILAQUA, L. R., ROSSATO J. I., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I., CAMMAROTA, M. **Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall.** Behavioral and Pharmacology, 2003.

BERLAU, D.; MCGAUGH, J. **Enhancement of extinction memory consolidation: The role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala.** Neurobiology of Learning and Memory, Set. 2006.

BLANCO, M., CANTO-DE-SOUZA, A. L. **Ansiedade, memória e transtorno de estresse pós-traumático.** CES Psicol [Internet]. Acesso em: dez/2018. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S201130802018000200053&lng=en. <http://dx.doi.org/10.21615/cesp.11.2.5>, 2018

BLISS, T.V.P, COLLINGRIDGE, G.L . **Um modelo sináptico de memória : potenciação de longo prazo no hipocampo .** Natureza 361: 31 – 39, 1993.

BOULTON, A.A., EISENHOFER, G. **Metabolismo da catecolamina: da compreensão molecular ao diagnóstico clínico e tratamento.** Adv Pharmacol; 42: 273-292, 1998.

BROADBENT, N.J , SQUIRE, L.R , CLARK, R.E. **Memória espacial, memória de reconhecimento e o hipocampo .** Proc Natl Acad Sci. USA, 2004 .

CAMMAROTA, M., BEVILAQUA, L.R., KERR, D., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I. **Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstallment of an extinguished conditioned fear response.** Eur J Neurosci., 2003.

COLIN, M. O'CARROL, STEPHEN, J. MARTIN, JOHAN, S. **Dopaminergic modulation of the persistence of one-trial hippocampus-dependent memory.** Learn. Mem 2006.

CURRAN, H. V.; ROBBINS, T. W. **Special issue on consolidation, reconsolidation and extinction.** Psychopharmacology, v. 226, n. 4, p. 627–629, 14 mar. 2013.

DAVIS, C.D., JONES, F.L., DERRICK, B.E. **Novel environments enhance the induction and maintenance of long-term potentiation in the dentate gyrus.** J. Neurosci. 2004.

DE LA CRUZ, V. et al. **Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories.** European Journal of Neuroscience, v. 28, n. 7, p. 1377–1381, out. 2008.

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

DUVARCI, S., PARE, D. **Amygdala microcircuits controlling learned fear.** Neuron 82, 966-80, 2014.

DUZEL, E., BUNZEC, N., GUITART-MASIP M & DUZEL, S. **Novelty related motivation of anticipation and exploration by dopamine (NOMAD): implications for healthy aging.** *Neurosci Biobehav Rev* 34: 660–669. 2010.

EHRLICH, I., HUMEAU, Y., GRENIER, F., CIOCCHI, S., HERRY, C., LUTHI, A. **Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory.** *Neuron* 62, 757-71, 2009.

ETTEN, M. L., TAYLOR, S. **Comparative Efficacy of Treatments for Posttraumatic Stress Disorder: A Meta-Analysis.** *Clinical Psychology and Psychotherapy*, v. 5, p. 126-144, 1998.

FENKER, D.F., FREY, J.U, SCHUETZE, H., HEIPERTZ, D., HEINZE, H.J, DUVEL, E. **Novel scenes improve recollection and recall of words.** *J Cogn Neurosci*, Jul;20(7):1250-65, 2008.

FERRY, B., ROOZENDAL, B., McGAUGH JL. **Basolateral amygdala noradrenergic influences on memory storage are mediated by na interaction between beta- and alfa-adrenoceptores.** *Journal of Neuroscience* ,1999.

FIORENZA, N. G. et al. **Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas.** *Behavioural Brain Research*, v. 232, n. 1, p. 210–216, jun. 2012.

FLAVEL, J. H., MILLER, P. H., & MILLER, S. A. **Desenvolvimento cognitivo** (3. ed.). Porto Alegre, RS: Artmed, 1999.

FREY, U., SCHROEDER H, MATHIES H. **Dopaminergic antagonists prevent long-term maintenance of posttetanic LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices.** *Brain Revist*, 1990.

FREY, U., MORRIS, R. **Synaptic tagging and long-term potentiation.** *Nature*, 385 (6),533–536, 1997.

FURINI, C. R. G. et al. **New frontiers in the study of memory mechanisms.** *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 35, n. 2, p. 173–177, abr. 2013.

FUSTER, J. **Memory and the cerebral cortex.** London. 1995.

GASBARRI, A., SULL, A., PACHARD, M.G. **The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat.** *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 1997.

GENZEL, L. et al. **The yin and yang of memory consolidation: hippocampal and neocortical.** *PLoS Biol.* 15, 2017.

GOODNIGHT, J.R.M., RAGSDALE, K.A., RAUCH, S.A.M., ROTHBAUM, B.O. **Psychotherapy for PTSD: an evidence-based guide to a theranostic approach to treatment.** *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatr*, 2018.

HAUBRICH, J. **Explorando a natureza lábil da memória: modulação dos processos de extinção e reconsolidação para atenuar persistentemente respostas de medo.** Dissertação, Porto Alegre, 2017.

HAYASHI, Y. **Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: Requirement for GLUR1 and PDZ Domain Interaction.** Sciense, 2000.

HERRY, C., JOHANSEN, J.P. **Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits.** Nat Publ Gr 17: 1644–1654, 2014.

IZQUIERDO, I. **A arte de esquecer.** Porto Alegre: ARTMED, 2002.

IZQUIERDO, I. **A arte de esquecer.** Rio de Janeiro: Vieira & Lent; 2004.

IZQUIERDO, I. **Memória.** Porto Alegre: Artmed. 2011.

IZQUIERDO, I., MYSKIW, J., BENETTI, F., FURINI, C., **Memória: tipos e mecanismos – achados recentes.** REVISTA USP, SP, n. 98 , 2013

IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H., VIANNA, M.R.M., BARROS, D.M. **Separate mechanisms for short- and long-term memory.** Behavirol brain research. 1999.

IZQUIERDO, I., MCGAUGH JL. **Effect of a novel experience prior to training or testing on retention of an inhibitory avoidance task in mice: involvement of an opioid system.** Behav Neural Biol 1985.

IZQUIERDO, I., QUEVEDO, J., IZQUIERDO, L.A., VIANNA M.R.M., SZAPIRO, G., BARROS, D.M., et al. **What can go wrong when memory fails: the main biochemical events underlying consolidation and retrieval in rats.** In: Archer T, Palomo T, Beninger R, editors. Neurodegenerative disorders and their treatment. Madrid: Complutense; 2000.

IZQUIERDO, I. et al. **Mechanisms for memory types differ.** *Nature*, v.393, p.635-6, 1998.

IZQUIERDO, I., AND J. L. MCGAUGH. **Behavioural Pharmacology and Its Contribution to the Molecular Basis of Memory Consolidation.** Behav Pharmacol, 2000.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R. M.; CAMMAROTA, M. **A arte de esquecer. Estudos Avançados.** v. 20, n. 58, p. 289–296, dez. 2006.

JAMES, W. **The principles of psychology.** Chicago, IL: William Benton, 1890.

JANAK, P.H., TYE, K.M. **From circuits to behaviour in the amygdala.** *Nature*, 2015.

JAY, T. M. Dopamine: **A potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms.** Prog. Neurobiol 2003; 69: 375–90. 38.

KANDEL, E; JAMES H. S; SCHWARTZ, T. M. **Princípios da neurociência.** São Paulo: Ed: Manole, 2002.

KAPLAN, G. B.; MOORE, K. A. **The use of cognitive enhancers in animal models of fear extinction.** Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 99, n. 2, p. 217–228, ago. 2011.

KETY, SS. **Toward hypotheses for a biochemical component in the vulnerability of schizophrenia.** Semin Psychiatry, 1972.

KESSLER, R., SONNEGA, A., BROMET, E., HUGHES, M., & Nelson, C. **Posttraumatic Stress Disorder in the National Comorbidity Survey.** Arch Gen Psychiatry, 52(12), 1048-1060, 1995.

KOPEC, C. D. REAL, E., KESSELS, H.W., & MALINOW, R. **GLUR1 links structural and functional plasticity at excitatory synapses.** The Journal of neuroscience, 2007.

KISHIYAMA, M.M., YONELINAS, A.P., LAZZARA, M.M. **O efeito de von Restorff na amnésia: a contribuição do sistema hipocampal para os aprimoramentos de memória relacionados à novidade .** Jornal de neurociência cognitiva. Volume 16, RJ, 2004.

LALUMIERE, R.T., NGUYEN, L. T. **Post-training intrabasolateral amygdala infusions of dopamine modulate consolidation of inhibitory avoidance memory: involvement of noradrenergic and cholinergic systems.** Eur J Neuroscience, 2004.

LEE, J. L.C., NADER, K. SCHILLER, D. **An update on memory reconsolidation updating.** Trends and cognitive sciences, 2017.

LI, S., CULLEN, W.K., ANWYL, R., ROWAN, M.J. **Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty.** Nat. Neurosci, 2003.

LISMAN, J.E. and GRACE, A.A. **The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory.** Neuron 46, 703–713, 2005.

LISMAN, J. et al. **A neoHebbian framework for episodic memory; role of dopamine-dependent late LTP.** Trends Neurosci. 34, 536–547, 2011.

LOPES, I.A., PINTO CORREA, J. SOARES-FORTUNATO, J.M. **Desenvolvimento dos mecanismos dopaminérgicos cerebrais.** Revis. Portuguesa de Psicossomática, 2003.

LONGONI, A.M., **A memória: nós somos o que lembramos e esquecemos.** Edição Loyola, SP, Paulinas, 2003.

LUCAS, K., LUCK, C.C., LIPP, O.V. **Novelty-facilitated extinction and the reinstatement of conditional human fear.** Behav Res Ther. 2018.

MAREN, S., PHAN, K.L., LIBERZON, I. **The contextual brain : implications for fear conditioning , extinction and psychopathology.** Nat Neurosci 14: 417–428, 2013.

MARGIS, R., PICON, P., COSNER, F.A., SILVEIRA, O.R. **Relação entre estressores, estresse e ansiedade.** Revista em Psiquiatria, RS, 2003.

MCGAUGH, J. L.; IZQUIERDO, I. **The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation.** Trends in pharmacological sciences, v. 21, n. 6, p. 208–210, jun. 2000.

MEDINA, J. H., BEKINSCHTEIN, P., CAMMAROTA, M., AND IZQUIERDO, I. **Do Memories Consolidate to Persist or Do They Persist to Consolidate?.** Behav Brain Res 192, no. 1 (2008): 61-9.

MELLO-CARPES, P. B., & IZQUIERDO, I. **The Nucleus of the Solitary Tract --> Nucleus Paragigantocellularis --> Locus Coeruleus --> CA1 region of dorsal 124 hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory.** Neurobiol Learn Mem, 100, 56-63, 2013.

MELLO-CARPES, P. B. M. **Participação da via NTS-PGI-LC-Hipocampo (Núcleo do Trato Solitário-Núcleo Paragigantocelular-Locus Coeruleus-Hipocampo) na consolidação da memória de reconhecimento de objetos.** 2010. 161 f.: il. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, 2010

MEI, B. et al. **NMDA Receptors Are Not Required for Pattern Completion During Associative Memory Recall.** PLoS ONE, v. 6, n. 4, p. e19326, 29 abr. 2011.

MENEZES, J., ALVES, N., BORGES, S. , ROEHRS, R. , MYSKIW, J. , FURINI, C. , IZQUIERDO, I. , MELLO-CARPES, P. **Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus.** Rev. PNAS, Porto Alegre, 2015.

MERHAY, M.& ROSENBLUM, K. **Facilitation of taste memory acquisition by experiencing previous novel taste is protein-synthesis dependent.** *Learn. Mem.* 15, 501–507, 2008.

MILAD, M. R.; QUIRK, G. J. **Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction.** Nature, v.26, p.70-4, 2002.

MISSALE, C., NASH, S.R., ROBINSON, S.W., JABER, M., CARON, M.G. **Dopamine receptors: from structure to function.** Physiol Rev 1998.

MOSER, E.L., ANDERSEN, P. **Potenciação de sinapses dentadas iniciadas por aprendizado exploratório em ratos: dissociação da temperatura cerebral, atividade motora e excitação.** *Aprender. Mem*, 1994.

MUELLER, D.; CAHILL, S. P. **Noradrenergic modulation of extinction learning and exposure therapy.** Behavioural Brain Research, v. 208, n. 1, p. 1–11, mar. 2010.

MYSKIW, J. C.; BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. **Behavioral Tagging of Extinction Learning.** Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 110, 2013.

MOURÃO JÚNIOR, C. A.; FARIA, N. C. **Memória.** Psicologia: reflexão e crítica, v. 28, n. 4, p. 780–788, 2015.

MONCADA, D., BALLARINI, F., MARTINEZ, M., FREY, J., VIOLA, H. **Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation.** PNAS, 108 (31), 12931-12936, 2011.

NADER, K. SCHAFFÉ, G.E. LE DOX J.E. **The labile nature of consolidation theory.** Nature Reviews Neuroscience, p. 216-218. 2000

NASCIMENTO, A.S., MAGALHÃES, A., ROCHA, M.L., LUCCHESI, M.A. **CHEMICAL COMPOSITION AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM *Myrcia rostrata* DC. (MYRTACEAE) IN ANIMAL MODEL.** Quím. Nova vol.41 no.9 São Paulo Sept. 2018

OPPMER, E.M., KORTEKASS, R., ALEMAN, A. **Depression and the role of genes involve in dopamine metabolism and signaling.** Prog Neurobiol, 2010.

ORSINI, C. A.; YAN, C.; MAREN, S. **Ensemble coding of context-dependent fear memory in the amygdala.** Frontiers in behavioral neuroscience. v. 7, p. 199, 2013.

PAVLOV, I. P. **Conditioned Reflexes** New York, Dover, 1959.

PARE, D., DUVARCI, S. **Amygdala microcircuits mediating fear expression and extinction.** Curr Opin Neurobiol 22, 717-23, 2012.

PARK S.K, NGUYEN M.D., FISCHER A., LUKE M.P, AFFAR E.L. B., DIEFFENBACH P.B, TSENG H.C., SHI Y. TSAI L.H. **Parl-4 links dopamine signaling and depression.** Cell, 2005.

PAXINOS, G., WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.** Sydney, Orlando: Academic Press, 2nd ed. 1986.

PORTO, W. G. **Memória e emoção.** São Paulo: Artes médicas, 2006.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E., BRILEY, M. **Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.** J Neurosci Methods, 1985.

PIETRZAK, H.R., J. D. GALLEZOT, Y. S. DING et al., **Association of posttraumatic stress disorder with reduced in vivo norepinephrine transporter availability in the locus coeruleus.** JAMA Psychiatry, vol. 70, pp. 1199–1205, 2013.

PEARCE, J.M. HALL, H., **A model for Pavlovian learning: variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli,** Psychol. Rev. 1980.

REDONDO, R.L. MORRIS, R.G.M. **Making memories last: the synaptic tagging and captures hypothesis.** Nature reviews. Neuroscience. P. 17-30, 2011.

RESCORLA, R. A. **Spontaneous recovery varies inversely with the training-extinction interval.** Learning & behavior, v. 32, n. 4, p. 401–408, nov. 2004.

ROSSATO, J. I. et al. **Dopamine controls persistence of long-term memory storage.** Science (New York, N.Y.), v. 325, n. 5943, p. 1017–1020, 21 ago. 2009.

RODRIGUES, B. **Estudo da participação do sistema dopaminérgico na formação da memória de reconhecimento em ratos.** Dissertação, POA, 2016.

SHARMA, S.; RAKOCZY, S.; BROWN-BORG, H. **Assessment of spatial memory in mice.** Life Sciences. v. 87, n. 17-18, p. 521–536, out. 2010.

SCHUCHARD, J.; THOMPSON, C. K. **Implicit and Explicit Learning in Individuals with Agrammatic Aphasia.** Journal of Psycholinguistic Research, 27 mar. 2013.

SANDRINI, M. et al. **Causal Role of Prefrontal Cortex in Strengthening of Episodic Memories through Reconsolidation.** Current Biology, v. 23, n. 21, p. 2181–2184, nov. 2013.

SAJIKUMAR, S., FREY, J.U. **Late-associativity, synaptic tagging, and the role of dopamine during LTP and LTD.** Neurobiol. Learn. Mem. 2004.

SARA, S.J., VANKOY, A. e HERYE, A. **Respostas evocadas por locus coeruleus em ratos que se comportam: uma pista sobre o papel da noradrenalina na memória.** Cérebro Res. Touro. 1994

SQUIRE, L. R. et al. **Memória.** Porto Alegre: Artmed, 2003.

SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. **Memória: da mente às moléculas,** Porto Alegre, Artmed Editora S.A, 2003.

SQUIRE, L. R. **Memory and hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans.** Psychological review. Volume 99, p. 195, 1992.

SILVEIRA, C. **Papel dos receptores histaminérgicos hipocampais na extinção de memórias aversivas.** Dissertação, POA, 2007.

SIMON, P. DUPUIS, R. & COSTENTIN, J. **Thigmotaxis as na index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions.** Behavioural Brain Research, 1994.

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

STRAUBE, T., VOLKER, K., DETLEF, B. **Requirement of β -adrenergic receptor activation and protein synthesis for LTP-reinforcement by novelty in rat dentate gyrus.** J Physiol . 1 de novembro de 2003.

STRIEN, V., CAPPAERT, NL., WITER, MP. **The anatomy of memory: na interactive overview of the parahippocampal- hippocampal Network,** Revista Neuroscince, 2009.

TAKEUCHI, T. et al. **Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory.** Nature, 2016.

TRUJILLO, B. C., FLORES, G., ARIAS-MONTANO, A.J. **Dopamina, síntese, liberação, e receptors no Sistema nervosa central.** Rev Biomed, 2000.

VALLONE, D., PICETTI, R., BORRELLI, E. **Structure and function of dopamine receptors.** Neurosci Biobehav Ver. 2000.

VANKOV, A., HERVE-MINVIELLE, A. e SARA, S.J. **Resposta à novidade e sua rápida habituação em neurônios do locus coeruleus do rato que explora livremente.** EUR. J. Neurosci. 1995.

VIANNA et al. **Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in rat hippocampus.** Proc. Nat. Acad. Sci., v.98, p.12251-4, 2001.

VIANNA, M. R. et al. **Role of the hippocampus and amygdala in the extinction of fear-motivated learning.** Curr. Neurovasc. Res., v.1, p.55-60, 2004.

XAXIER G. F. **Memória: correlatos anátomo-funcionais.** In: Nitrini R, Caramelli P, Mansur LL, Editors. Neuropsicologia: das bases anatômicas à reabilitação. São Paulo: Clínica Neurológica, Hospital das Clínicas, FMUSP; 1996.

YAMASAKI, M. & TAKEUCHI, T. **Locus coeruleus and dopamine-dependent memory consolidation.** Neural Plast. 2017.

ZANTO, T. P. et al. **Causal role of the prefrontal cortex in top-down modulation of visual processing and working memory.** Nature Neuroscience, v. 14, n. 5, p. 656– 661, 27 mar. 2011.

GARRIDO ZIN, C.; CLAIRIS, N.; CAVALCANTE, E.L.; FURINI, R.C.; MYSKIW, J.; IZQUIERDO, I. **Major neurotransmitter systems in dorsal hippocampus and basolateral amygdala control social recognition memory.** PNAS, p. 4918. Poa, 2016.

WANG S.H. et al. **Relevance of synaptic tagging and capture to the persistence of long-term potentiation and everyday spatial memory.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 2010.

WICHERT, S.; WOLF, O. T.; SCHWABE, L. **Changing memories after reactivation: a one-time opportunity?** Neurobiology of learning and memory, v. 99, p. 38–49, jan. 2013.

WITTMANN, B.C., SCHOTT, B.H., GUDERIAN, S., FREY, J.U., HEINZE, H.J., DUZEL, E. **Rewardrelated fMRI activation of dopaminergic midbrain is associated with enhanced hippocampus-dependent long-term memory formation.** Neuron 2005.

WISE, R.A. **Forebrain substrates of reward and motivation.** J Comp Neurol ,2005.

WOOLFE, G. & A. D. MACDONALD. **The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol).** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics March,1944.

ANEXO 10



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)



Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55)3911-0200, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 018/2017

Título: Mecanismos envolvidos no efeito da novidade na extinção e persistência das memórias aversivas.

Data da aprovação: 28/06/2017

Período de vigência do projeto: 28/06/2019

Pesquisadores(a): Pâmela Billing Mello Carpes

Campus: Uruguiana

Telefone: (55) 99661-2454

E-mail: pamelacarpes@unipampa.edu.br

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	280 g / 90 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria

Profª. Drª. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA