

PUCRS

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

SCHEILA DAIANE SCHMIDT

**MODULAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO SOB DIFERENTES ASPECTOS:
UM ESTUDO DINÂMICO ENVOLVENDO A
NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA,
AS ENZIMAS ANIDRASES CARBÔNICAS E O ESTRESSE DO TIPO SOCIAL**

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

SCHEILA DAIANE SCHMIDT

**MODULAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO SOB DIFERENTES ASPECTOS:
UM ESTUDO DINÂMICO ENVOLVENDO A
NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA,
AS ENZIMAS ANIDRASES CARBÔNICAS E O ESTRESSE DO TIPO SOCIAL**

Porto Alegre

2018

SCHEILA DAIANE SCHMIDT

**MODULAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO SOB DIFERENTES ASPECTOS:
UM ESTUDO DINÂMICO ENVOLVENDO A
NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA,
AS ENZIMAS ANIDRASES CARBÔNICAS E O ESTRESSE DO TIPO SOCIAL**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Izquierdo

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Jociane de Carvalho Myskiw

Porto Alegre

2018

Ficha Catalográfica

S354m Schmidt, Scheila Daiane

Modulação da memória de medo sob diferentes aspectos : um estudo dinâmico envolvendo a neurotransmissão serotoninérgica, as enzimas anidrases carbônicas e o estresse do tipo social / Scheila Daiane Schmidt . – 2018.

115 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Izquierdo.

Co-orientadora: Profa. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw.

1. Memória de medo. 2. Consolidação, Reconsolidação e Extinção. 3. Sistema serotoninérgico. 4. Anidrases carbônicas. 5. Estresse de instabilidade social.
I. Izquierdo, Ivan. II. Myskiw, Jociane de Carvalho. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

SCHEILA DAIANE SCHMIDT

**MODULAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO SOB DIFERENTES ASPECTOS:
UM ESTUDO DINÂMICO ENVOLVENDO A
NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA,
AS ENZIMAS ANIDRASES CARBÔNICAS E O ESTRESSE DO TIPO SOCIAL**

Tese apresentada como requisito para
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de
Pós-Graduação em Medicina e Ciências da
Saúde da Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Rodrigo Grassi-Oliveira – PUCRS

Prof^a. Dr^a. Nadja Schröder – UFRGS

Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto – UFRGS

Prof. Dr. Weber Cláudio F. Nunes da Silva – UNICENTRO

Prof^a. Dr^a. Mônica Ryff Moreira Roca – PUCRS (Suplente)

Porto Alegre

2018

Dedico essa tese de doutorado aos meus pais, Vera e Darci...

Devo tudo a vocês, meus amores, meus tesouros!!!

AGRADECIMENTOS

Àquele que é infinitamente superior a tudo! Obrigada **Deus** pela oportunidade de vir a este mundo, predestinada a conhecer todas as pessoas que passaram pela minha vida e que, de alguma maneira, me ensinaram algo. Foste extremamente generoso comigo, obrigada Pai.

Aos meus amados pais, **Vera e Darci**. A história de um indivíduo começa muito antes deste nascer. A minha, por obra e graça de Deus, começou com vocês. E com vocês eu aprendi aquelas que considero as maiores virtudes de um ser humano, aprendi a ser humilde e a ser grato. Obrigada mãe, obrigada pai...não somente pelos ensinamentos, mas também por todo o amor, dedicação e entrega de vocês! Eu jamais teria chego até aqui sem o apoio e a presença de vocês na minha vida. Amo vocês com toda a ternura e admiração que um filho possa ter para com seus pais!

À minha irmã **Bianca**. Tua chegada, aos meus 13 anos, foi minha maior felicidade. Eu sabia que, a partir daquele dia, eu teria uma amiga para a vida toda, uma amiga com quem eu poderia sempre contar. Obrigada por essa amizade mana, pelo teu carinho e apoio constantes. Obrigada por ter me apresentado o Centro de Memória e me auxiliado nos meus primeiros passos dentro do lab. Bi, você foi minha inspiração para voltar a estudar, te amo! Também te agradeço por ter “cuidado” dos nossos pais enquanto eu estava fora, dando a eles toda a atenção que eu, presencialmente, não pude dar. Estendo esse agradecimento ao meu cunhado **Claudio**, que com imensa doçura se preocupa com a minha família como se fosse a dele.

Ao meu esposo, **Fábio**, meu melhor presente de Natal. Obrigada por sonhar comigo os meus sonhos e não medir esforços para realizá-los. Obrigada por cuidar de mim tão bem, principalmente durante o nosso período na Itália (foi maravilhoso, mas também foi muito difícil). Obrigada por sempre acreditar que eu sou capaz, mesmo quando nem eu acredito. Obrigada pela paciência que tens comigo, sei que muitas vezes não mereço. Obrigada por ser meu parceiro nessa jornada chamada vida, es tudo o que eu sempre sonhei. Essa tese de doutorado não teria se realizado da mesma maneira sem o teu apoio. Te amo!

Ao meu orientador, **Prof. Ivan Izquierdo**. Serei eternamente grata ao senhor por ter me recebido no seu grupo e confiado na minha capacidade. Me sinto honrada em ser sua aluna e em fazer parte do Centro de Memória! Obrigada não só pelos ensinamentos Mestre, mas também pela doçura e humildade com que nos trata diariamente. A sua obra me inspira.

À minha co-orientadora, **Prof. Jociane de Carvalho Myskiw**. Obrigada por acreditar em mim e por todas as oportunidades que me deste. Obrigada por tudo o que me ensinaste, por

conduzir meus passos na pesquisa e pelo apoio incondicional. A tua contribuição na realização deste trabalho e no meu crescimento pessoal e profissional é imensurável.

À **Prof. Cristiane R. G. Furini**, pelos valiosos ensinamentos e por todos os momentos compartilhados (inclusive nossas idas e vindas em Berlim). Obrigada pelas inúmeras conversas e conselhos. A tua ajuda e o teu apoio foram imprescindíveis durante toda a minha trajetória como pós-graduanda.

Ai **Professori Patrizio Blandina e Maria Beatrice Passani**, miei tutor presso l'Università degli Studi di Firenze. Realizzare un periodo di ricerca all'estero durante il dottorato è sempre stato un mio grande sogno che sono riuscita a realizzare grazie all'opportunità che mi avete dato. Vi ringrazio per la vostra fiducia e per tutti i vostri insegnamenti. È stata una esperienza indimenticabile!

Ao Coordenador do Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, **Professor Alexandre Vontobel Padoin**. Obrigada por estar sempre disponível a me auxiliar de alguma maneira. Tua ajuda foi muito importante professor, obrigada.

Às **Professoras Nadja Schroder e Maria Martha Campos**, que me orientaram nos estágios docentes e reforçaram em mim o sentimento de que ensinar é realmente fascinante.

À banca examinadora, composta pelos **Professores Rodrigo Grassi, Carlos A. Netto, Weber Cláudio e Nadja Schroder**. Obrigada por terem aceitado o convite e compartilharem comigo seus conhecimentos e experiências. Sou muito grata a vocês pelas correções, sugestões e críticas para o aprimoramento da minha tese de doutorado.

À todos os colegas que fizeram ou fazem parte do Centro de Memória, muito obrigada pela ajuda e colaboração em diversas etapas do meu trabalho! **Bruna Saenger, Leticia Bühler, Jonny Behling, Patrícia Peixoto, Fernanda Rodrigues, Vitória D'Ávila, Eduarda Nachtigall, Clarissa Penha, Eduardo de Assis Brasil, Roberta Fabbri e demais colegas**, o auxílio de vocês foi fundamental. Valeu pessoal!

Às “pós-graduandas top” (risos), companheiras de experimentos que se tornaram amigas para a vida toda. Foram muitos os momentos compartilhados, até que cada uma seguiu o seu destino, mas, mesmo longe e não nos vendo com frequência, continuamos unidas e próximas. **Carolina G. Zinn, Lorena Cavalcante e Flávia Ferreira**, a amizade de vocês significa muito para mim. Vocês são um grande presente que o Centro de Memória me deu!

Ao pesquisador e amigo **Gustavo Provensi**, que me acompanhou e me guiou durante todo o período que estive na *Università degli Studi di Firenze*. Tuas ideias e teu conhecimento foram fundamentais para o desenvolvimento de várias etapas dessa tese de doutorado. Obrigada por todos os ensinamentos e toda a ajuda que me deste (financeira, intelectual e emocional).

Obrigada por todas as dicas com relação a vida em Florença e por falar comigo em português, foi um alento te ter no laboratório. Sou muito grata por ter te conhecido Gus.

Alle mie colleghe di laboratorio ed amiche italiane **Alessia Costa, Barbara Rani e Carmen Carbone**. Mi ricordo del nostro primo incontro: io parlavo portoghese e voi italiano. Comunicare tra noi all'inizio non è stato facile, ma l'affetto e l'amicizia, apparsi sin da subito, hanno aiutato a superare le difficoltà linguistiche. Questi due anni in Italia sono stati piu belli grazie a voi! Vi ringrazio per il sostegno in tante situazioni. Voi siete molto speciali per me, vi porto nel mio cuore! Spero di rivedervi presto.

Ad **Alessia, Antonio ed Enrica**, grazie di tutto carissimi amici, soprattutto per averci ospitato (a me, Fábio e tutte le nostre valigie) prima della nostra partenza. Le parole non sono abbastanza per ringraziarvi, comunque, grazie davvero per il vostro affetto e gentileza.

A **Romina e Francesco**, per la vostra disponibilità ad aiutarmi con la immunoistochimica. Parte di questo lavoro solo è stato possibile grazie a voi.

A tutti gli italiani che ho conosciuto durante il mio soggiorno in Italia e che porterò sempre con me: **Davide, Marco, Martina, Piera, Alex, Chiara e Giulia**...grazie ragazzi.

Aos brasileiros que conheci ao chegar em Florença, **Zeumary e Igor**, que nos ajudaram no nosso difícil início na cidade e se fizeram presentes ao longo de toda a nossa estadia na capital da Toscana.

As famílias **Schmidt, Germano e Gamallo**. Obrigada pela torcida e carinho. Um agradecimento especial para: **Vó Vilma, Tio Godói, Tia Zete, Tio Gelson, Tia Eliza, Inha Márcia, Comadre Tatiana, Cunhada Adriana e Sogra Lucita**. Vocês têm um lugar especial no meu coração!

La familia española, en especial **Blanca y Maribel**. Todo esto comenzó en Santiago de Compostela, con la vuestra ayuda. Gracias por el cariño y apoyo.

A los amigos **Fernanda e Beni**, por la amistad verdadera. Haber conocido ustedes fue un regalo de Dios.

Aos amigos **Simone e Clovis**, que nos hospedaram em Barcelona e me possibilitaram escrever parte desta tese com calma e tranquilidade. Obrigada pela amizade, carinho e ajuda.

A todos os amigos e demais pessoas que torceram por mim e, de alguma forma, participaram deste momento da minha vida e contribuíram para a elaboração deste trabalho.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e à *Università degli Studi di Firenze* pelo apoio financeiro e infraestrutura necessários à execução deste trabalho.

À CAPES e ao Ministério dos Negócios Estrangeiros e de Cooperação Internacional da Itália, pelas bolsas de estudos.

*E a memória continua, implacável,
atravessando as fronteiras do tempo e do espaço,
nos dizendo a cada momento quem somos, onde estamos
e, muitas vezes, por quê. Sempre, se soubermos interpretá-la.*

*Creio que a memória persiste além da nossa morte;
não sei se nossa alma persiste, sei que nosso corpo não,
mas não tenho muitas dúvidas quanto à memória.*

(IZQUIERDO, 1998)

RESUMO

O medo condicionado é uma importante forma de aprendizagem e de memória, sendo essencial para a adaptação, manutenção e sobrevivência das espécies animais. Diferentes substratos neurais e áreas cerebrais são requeridos nos processos de consolidação, reconsolidação e extinção da memória de medo. O presente estudo teve como objetivos verificar (i) a participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ sobre os processos de estabilização da memória de medo condicionado ao contexto (MCC), (ii) o envolvimento das enzimas anidrases carbônicas (AC) sobre a extinção da memória de MCC e (iii) os efeitos do estresse de instabilidade social sobre a consolidação da memória de MCC. Para isso, ratos *Wistar* machos foram submetidos a tarefa de MCC. Verificou-se que, na região CA1 do hipocampo dorsal, o bloqueio do receptor 5-HT_{5A} e a ativação do receptor 5-HT₆ não interferem na consolidação, porém prejudicam a reconsolidação da memória de MCC. Observou-se ainda que o bloqueio do receptor 5-HT₆, da região CA1, prejudica a consolidação, mas não interfere na reconsolidação da memória de MCC. Interessantemente, observou-se que o bloqueio do receptor 5-HT₇, da região CA1, modula a consolidação e a reconsolidação da memória de MCC, facilitando ambos os processos. Verificou-se também que a inibição das anidrases carbônicas não prejudica a aquisição, mas sim a consolidação da memória de extinção de MCC. Esse prejuízo ocorreu através de um mecanismo central de ação, no qual as regiões CA1 do hipocampo, amígdala basolateral e córtex pré-frontal ventromedial (vmPFC) estão envolvidas. Os animais que demonstraram um prejuízo na consolidação da memória de extinção de MCC após a inibição das AC no vmPFC, apresentaram um aumento na expressão de c-Fos nessa região. Para finalizar, observou-se que o estresse de instabilidade social na adolescência prejudica a consolidação da memória de MCC, efeito este que persiste na idade adulta. Uma dieta rica em Vitamina A e ômega-3 foi capaz de prevenir esse prejuízo em ambas as fases da vida. Os animais estressados com a dieta controle apresentaram uma redução na expressão do BDNF hipocampal na adolescência e na idade adulta, a qual também foi prevenida em ambos os períodos pelo consumo da dieta enriquecida. Os resultados obtidos neste trabalho possibilitam ampliar a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes aos processos de consolidação, reconsolidação e extinção da memória de MCC, servindo como base para pesquisas futuras que buscam o tratamento de condições clínicas nas quais o processamento da memória de medo está alterado.

Palavras-chave: memória de medo, consolidação, reconsolidação, extinção, sistema serotoninérgico, anidrases carbônicas, estresse de instabilidade social.

ABSTRACT

Conditioned fear is an important form of learning and memory, being essential for the adaptation, maintenance and survival of animal species. Different neural substrates and brain areas are required in the consolidation, reconsolidation and extinction processes of fear memory. The aim of the present study was to verify (i) the role of 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ serotonin receptors on the stabilization processes of contextual fear conditioning (CFC) memory, (ii) the involvement of the carbonic anhydrases enzymes (CAs) on the extinction of CFC memory and (iii) the effects of social instability stress on the consolidation of CFC memory. For this, male Wistar rats were submitted to CFC task. It has been found that, in the CA1 region of the dorsal hippocampus, 5-HT_{5A} receptor blockade and 5-HT₆ receptor activation do not interfere on the consolidation, but impairs the reconsolidation of CFC memory. It was further observed that 5-HT₆ receptor blockade of the CA1 region impairs the consolidation, but does not interfere on the reconsolidation of CFC memory. Interestingly, blockade of the 5-HT₇ receptor of the CA1 region modulates the consolidation and reconsolidation of the CFC memory, facilitating both processes. It has also been found that the inhibition of CAs does not impair the acquisition, but rather the consolidation of the CFC extinction memory. This damage occurred through a central mechanism of action in which the CA1 regions of the hippocampus, basolateral amygdala and ventromedial prefrontal cortex (vmPFC) are involved. Animals that demonstrated impairment in the consolidation of CFC extinction memory after inhibition of CAs in vmPFC, showed an increase in c-Fos expression in this region. Finally, it was observed that social instability stress in adolescence impairs the consolidation of CFC memory, an effect that persists in adulthood. A diet rich in Vitamin A and omega 3 was able to prevent this effect at both stages of life. Animals stressed with the control diet had a reduction in the expression of hippocampal BDNF in adolescence and adulthood, which was also prevented in both periods by consumption of the enriched diet. The results obtained in this work make it possible to broaden the understanding of the molecular mechanisms underlying the processes of consolidation, reconsolidation and extinction of MCC memory, serving as a basis for future researches that seek the treatment of clinical conditions in which fear memory processing is altered.

Keywords: fear memory, consolidation, reconsolidation, extinction, serotonergic system, carbonic anhydrases, social instability stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo do protocolo de consolidação da memória de MCC	44
Figura 2: Esquema ilustrativo do protocolo de reconsolidação da memória de MCC	45
Figura 3: Desenho esquemático da área atingida pelas infusões farmacológicas	46
Figura 4: Esquema ilustrativo do protocolo de extinção da memória de MCC	58
Figura 5: Desenho esquemático da área atingida pelas infusões farmacológicas	60
Figura 6: Efeito da inibição das anidrases carbônicas sobre a consolidação da memória de extinção de MCC	63
Figura 7: Efeito da ativação das anidrases carbônicas sobre a memória de extinção de MCC	64
Figura 8: Efeito da inibição das anidrases carbônicas sobre a aquisição da memória de extinção de MCC	65
Figura 9: Efeitos da inibição das anidrases carbônicas cerebrais sobre a consolidação da memória de extinção de MCC	66
Figura 10: Expressão de c-Fos nas regiões CA1, BLA, vmPFC e SN após a evocação da memória de extinção de MCC	67
Figura 11: Esquema ilustrativo do protocolo de estresse de instabilidade social.....	74
Figura 12: Efeitos do estresse de instabilidade social e de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre o ganho de peso corporal na adolescência e idade adulta.....	79
Figura 13: Efeitos do estresse de instabilidade social e de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre a quantidade de dieta consumida na adolescência e idade adulta.....	80
Figura 14: Efeitos do estresse de instabilidade social e de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre o comportamento de anedonia na adolescência e idade adulta.....	81
Figura 15: Efeitos do estresse de instabilidade social e de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre a atividade locomotora e nível de ansiedade na adolescência e idade adulta ..	83
Figura 16: Efeitos do estresse de instabilidade social e de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre a consolidação da memória de MCC na adolescência e idade adulta.....	85
Figura 17: Expressão do BDNF nas regiões do hipocampo, amígdala e córtex frontal, de animais adolescentes e adultos, submetidos ao estresse de instabilidade social e a uma dieta rica em vitamina A e ômega-3.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da dieta controle.....	73
Tabela 2: Composição da dieta enriquecida	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTZ	Acetazolamida
ALA	Ácido alfa-linolênico, do inglês <i>Alpha-linolenic acid</i>
ANI	Anisomicina
AC	Anidrases carbônicas
AR	Ácido retinóico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BHE	Barreira Hematoencefálica
BLA	Amígdala basolateral, do inglês <i>Basolateral amygdala</i>
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico, do inglês <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CARPs	Proteínas relacionadas à anidrase carbônica, do inglês <i>Carbonic anhydrases related proteins</i>
CA1	Corno de Amon 1
CR	Resposta condicionada, do inglês <i>Conditioned response</i>
CS	Estímulo condicionado, do inglês <i>Conditioned stimulus</i>
DHA	Ácido docosahexaenoico, do inglês <i>Docosahexaenoic acid</i>
D-Phe	D-fenilalanina, do inglês <i>D-phenylalanine</i>
EPA	Ácido eicosapentaenoico, do inglês <i>Eicosapentaenoic acid</i>
ERKs	Quinases reguladas por sinal extracelular, do inglês <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
LTM	Memória de longa duração, do inglês <i>Long-term memory</i>
MCC	Medo condicionado ao contexto
mTOR	Proteína quinase alvo da rapamicina em mamíferos, do inglês <i>Mammalian target of rapamycin</i>
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NSCD	Não estressado com dieta controle, do inglês <i>Non stressed control diet</i>
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos, do inglês <i>Mitogen activated protein kinases</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês <i>Messenger ribonucleic acid</i>
PB	Tampão fosfato, do inglês <i>Phosphate buffer</i>

PFA	Paraformaldeído
PND	Dia pós-natal, do inglês <i>Postnatal day</i>
PTSD	Transtorno de estresse pós-traumático, do inglês <i>Post traumatic stress disorder</i>
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados, do inglês: <i>Polyunsaturated fatty acids</i>
RAR	Receptores de ácidos retinóicos
RXR	Receptor retinóide X, do inglês <i>Retinoid X receptor</i>
SCD	Estressado com dieta controle, do inglês <i>Stressed control diet</i>
SED	Estressado com dieta enriquecida, do inglês <i>Stressed enriched diet</i>
SIS	Estresse de instabilidade social, do inglês <i>Social instability stress</i>
SN	Substância nigra
SNC	Sistema nervoso central
STM	Memória de curta duração, do inglês <i>Short-term memory</i>
TrKB	Receptor de quinase B relacionado à tropomiosina, do inglês <i>Tropomyosin-related kinase B</i>
US	Estímulo incondicionado, do inglês <i>Unconditioned stimulus</i>
vmPFC	Córtex pré-frontal ventromedial, do inglês <i>Ventral medial prefrontal cortex</i>

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	19
CAPÍTULO I: MEMÓRIA E SISTEMAS ENVOLVIDOS NO PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA DE MEDO	20
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 MEMÓRIA: CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO	21
1.2 FORMAÇÃO, MANUTENÇÃO E MODIFICAÇÃO DA MEMÓRIA	23
1.3 MEMÓRIA DE MEDO	25
1.4 SISTEMA SEROTONINÉRGICO.....	28
1.5 ENZIMAS ANIDRASES CARBÔNICAS	31
1.6 ESTRESSE SOCIAL.....	34
1.7 VITAMINA A E ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3	36
2 JUSTIFICATIVA.....	39
CAPÍTULO II: MODULAÇÃO DA CONSOLIDAÇÃO E RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO AO CONTEXTO ATRAVÉS DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT_{5A}, 5-HT₆ E 5-HT₇.....	41
1 OBJETIVOS	42
1.1 OBJETIVO GERAL	42
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
2 MÉTODOS	42
2.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	42
2.2 CIRURGIA ESTEROTÁXICA	42
2.3 MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS	43
2.4 CONDICIONAMENTO CLÁSSICO.....	43
2.4.1 Protocolo de consolidação da memória de MCC	44
2.4.2 Protocolo de reconsolidação da memória de MCC	45
2.5 INTERVENÇÕES FARMACOLÓGICAS.....	45
2.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA REGIÃO ESTUDADA	46
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
3 ARTIGO CIENTÍFICO	48
CAPÍTULO III: PARTICIPAÇÃO DAS ENZIMAS ANIDRASES CARBÔNICAS NA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO DE MEDO AO CONTEXTO	55
1 OBJETIVOS	56
1.1 OBJETIVO GERAL	56

1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
2	MÉTODOS	56
2.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	56
2.2	CIRURGIA ESTEROTÁXICA	57
2.3	MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS	57
2.4	CONDICIONAMENTO CLÁSSICO.....	57
2.4.1	Protocolo de extinção da memória de MCC	57
2.5	INTERVENÇÕES FARMACOLÓGICAS.....	58
2.6	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA REGIÃO ESTUDADA	59
2.7	IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE C-FOS	60
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
3	RESULTADOS.....	61
3.1	PARTICIPAÇÃO DAS ANIDRASES CARBÔNICAS NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO DE MCC.....	62
3.2	PARTICIPAÇÃO DAS ANIDRASES CARBÔNICAS NA AQUISIÇÃO DA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO DE MCC	64
3.1	PARTICIPAÇÃO DAS ANIDRASES CARBÔNICAS CEREBRAIS NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO DE MCC	65
3.2	EXPRESSÃO DE C-FOS APÓS INIBIÇÃO DAS ANIDRASES CARBÔNICAS CEREBRAIS	66
4	DISCUSSÃO	68
CAPÍTULO IV: EFEITOS DO ESTRESSE SOCIAL E DE UMA DIETA RICA EM VITAMINA A E ÔMEGA-3 SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO AO CONTEXTO		
1	OBJETIVOS.....	72
1.1	OBJETIVO GERAL	72
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	72
2	MÉTODOS	72
2.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	72
2.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS E COMPOSIÇÃO DAS DIETAS	73
2.3	CONTROLE DO PESO CORPORAL E DO CONSUMO DAS DIETAS	73
2.4	PROTOCOLO DE ESTRESSE DE INSTABILIDADE SOCIAL.....	74
2.5	TESTE DE PREFERÊNCIA A SACAROSE.....	75
2.6	TESTE DE CAMPO ABERTO	75
2.7	CONDICIONAMENTO CLÁSSICO.....	76
2.7.1	Protocolo de consolidação da memória de MCC	76
2.8	WESTERN BLOT PARA VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO BDNF	76

2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
3	RESULTADOS.....	78
3.1	EFEITOS DO ESTRESSE DE INSTABILIDADE SOCIAL E DO CONSUMO DE UMA DIETA RICA EM VITAMINA A E ÔMEGA-3 SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL E A QUANTIDADE DE DIETA CONSUMIDA.....	78
3.1	EFEITOS DO ESTRESSE DE INSTABILIDADE SOCIAL E DO CONSUMO DE UMA DIETA RICA EM VITAMINA A E ÔMEGA-3 SOBRE O COMPORTAMENTO DE ANEDONIA	80
3.1	EFEITOS DO ESTRESSE DE INSTABILIDADE SOCIAL E DO CONSUMO DE UMA DIETA RICA EM VITAMINA A E ÔMEGA-3 SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA E O NÍVEL DE ANSIEDADE	82
3.1	EFEITOS DO ESTRESSE DE INSTABILIDADE SOCIAL E DO CONSUMO DE UMA DIETA RICA EM VITAMINA A E ÔMEGA-3 SOBRE A MEMÓRIA DE MCC.....	84
3.1	EFEITOS DO ESTRESSE DE INSTABILIDADE SOCIAL E DO CONSUMO DE UMA DIETA RICA EM VITAMINA A E ÔMEGA-3 SOBRE A EXPRESSÃO DO BDNF NAS REGIÕES CEREBRAIS DO HIPOCAMPO, AMÍGDALA E CÓRTEX FRONTAL	86
4	DISCUSSÃO.....	87
	CONCLUSÕES.....	90
	REFERÊNCIAS	92

APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado é resultado de três estudos, os quais buscaram investigar, separadamente, os mecanismos subjacentes à formação, manutenção e modificação da memória de medo ao contexto. O primeiro deles foi desenvolvido na Pontifícia Universidade Católica do RS, enquanto que o segundo e o terceiro foram realizados na *Università degli Studi di Firenze* na Itália, durante meu estágio doutoral no exterior.

Em virtude disto, a presente tese encontra-se dividida em quatro capítulos. No primeiro, será apresentada uma revisão da literatura acerca do tema memória, o qual incluirá a sua classificação e as diferentes fases envolvidas no processamento mnemônico. Uma vez que o foco desta pesquisa doutoral é a memória de medo condicionado ao contexto, será abordado alguns dos principais mecanismos moleculares envolvidos na formação desta memória e as estruturas cerebrais necessárias para seu processamento. Também será apresentada uma revisão sobre o sistema serotoninérgico, o grupo das enzimas anidrases carbônicas e o estresse do tipo social. O envolvimento desses elementos com os processos de aprendizagem e memória, sobretudo a memória de medo, será discutido nessa sessão. Para concluir, o leitor encontrará as justificativas que levaram à realização deste trabalho.

O segundo capítulo possui como tema principal o sistema serotoninérgico e o seu envolvimento com os processos de estabilização da memória de medo. Aqui, serão elencados os objetivos que guiaram este capítulo, métodos utilizados, resultados e discussão, estes dois últimos no formato de artigo científico original, o qual foi publicado na revista *Neurobiology of Learning and Memory* no ano de 2017.

O terceiro e quarto capítulos, ambos desenvolvidos sob a supervisão dos Professores Patrizio Blandina e Maria Beatrice Passani durante meu período sanduíche na Itália, abordam, respectivamente, a participação das anidrases carbônicas na extinção da memória de medo ao contexto e os efeitos do estresse de instabilidade social na consolidação dessa memória. Da mesma forma que na seção anterior, nestas também serão elencados os objetivos, métodos, resultados e discussão, porém, estes dois últimos serão apresentados em formato expandido.

Para finalizar, será apresentada uma sessão listando as principais conclusões oriundas desta tese de doutorado.

***CAPÍTULO I:
MEMÓRIA E SISTEMAS ENVOLVIDOS NO
PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA DE MEDO***

1 INTRODUÇÃO

1.1 Memória: Conceito e Classificação

Memória é a capacidade de aquisição, armazenamento e conservação de informações, as quais podem ser evocadas e utilizadas posteriormente (IZQUIERDO, 2011). Pode-se dizer que as memórias formam um conjunto de sistemas neurais que mantem a história pessoal de cada indivíduo, possibilitando que este modifique seu comportamento ao longo da vida (IZQUIERDO, 2011; SQUIRE; KANDEL, 2003). A maior parte do que um ser humano sabe sobre o mundo foi adquirida por meio de suas experiências e mantida pela sua memória, entretanto, quando a memória é perdida, como na doença de Alzheimer, o indivíduo perde a capacidade de recriar o passado e, em consequência disto, perde a conexão consigo mesmo e com os outros (SQUIRE; KANDEL, 2003).

A memória pode ser classificada em relação à natureza de seu conteúdo e em relação ao seu tempo de duração. Quanto à natureza de seu conteúdo, as memórias podem ser divididas em memórias explícitas (declarativas) ou implícitas (não declarativas) (BADDELEY; ANDERSON; EYSENCK, 2011; IZQUIERDO, 2011; KANDEL, 2001). As memórias explícitas podem ser subdivididas em episódica e semântica (SQUIRE; KNOWLTON; MUSEN, 1993; STERN; ALBERINI, 2013). As memórias episódicas possuem um contexto espacial e temporal (NADER; HARDT, 2009; SQUIRE; KNOWLTON; MUSEN, 1993). Referem-se a eventos aos quais o indivíduo assiste ou participa, como por exemplo, uma viagem, a formatura do filho, ou a sua própria formatura. Por sua vez, as memórias semânticas referem-se à conhecimentos de ordem geral, tais como a língua portuguesa, medicina, história, etc (BURIANOVA; MCINTOSH; GRADY, 2010; CONWAY, 2009; IZQUIERDO, 2011; KOMPUS et al., 2009; RENOULT et al., 2012).

A memória implícita compreende a memória de “como executar determinada atividade”, como por exemplo, a memória de habilidades motoras (MAYFORD; SIEGELBAUM; KANDEL, 2012; STERN; ALBERINI, 2013). Também são memórias implícitas a habituação (decréscimo da resposta a estímulos benignos repetidos), o *priming* (evocação de memória sob a apresentação de uma dica) e a memória decorrente do treinamento em tarefas de condicionamento clássico (memória associativa) (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2007; IZQUIERDO, 2011; SCHUCHARD; THOMPSON, 2014; SQUIRE; KNOWLTON; MUSEN, 1993).

A formação das memórias explícitas e implícitas depende de estruturas encefálicas diferentes (ALBRIGHT; KANDEL; POSNER, 2000; KANDEL, 2001; KOLB; WHISHAW, 2002; SQUIRE; WIXTED; CLARK, 2007). As memórias explícitas requerem a integridade do lobo temporal medial, que compreende o hipocampo, o giro denteado e o complexo subicular, juntamente com os córtices entorrinal, perirrinal e parahipocampal. Por sua vez, as memórias implícitas envolvem ainda diferentes estruturas, como a amígdala, os gânglios da base e o cerebelo (ALBRIGHT; KANDEL; POSNER, 2000; BAILEY; BARTSCH; KANDEL, 1996; BALDERAS et al., 2008; LEES; JONES; KANDEL, 2000; SQUIRE; WIXTED; CLARK, 2007). É importante ressaltar que as memórias implícitas e explícitas não são entidades distintas atuando sozinhas, elas coexistem e interagem frequentemente (STERN; ALBERINI, 2013).

Quanto a durabilidade, a memória pode ser classificada em: memória de trabalho, memória de curta duração e memória de longa duração. A memória de trabalho possibilita que o indivíduo compreenda o ambiente externo que lhe cerca, exercendo uma função executiva que auxilia o mesmo nas tomadas de decisões (BADDELEY; ANDERSON; EYSENCK, 2011; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2007). Este tipo de memória parece depender basicamente da atividade elétrica dos neurônios do córtex pré-frontal (IZQUIERDO, 2011; IZQUIERDO et al., 1998; ZANTO et al., 2011), não perdura mais do que 1 - 3 minutos e não forma “arquivos” (BADDELEY, 1992; D’ESPOSITO et al., 1995; IZQUIERDO, 2011; SCHUCHARD; THOMPSON, 2014).

As memórias de curta e de longa duração utilizam as mesmas estruturas cerebrais para seu processamento, como hipocampo, córtex entorrinal e amígdala, porém envolvem mecanismos moleculares independentes (IZQUIERDO, 2011). As memórias de curta duração (STM) persistem por poucos minutos até no máximo seis horas, não requerem síntese de RNA mensageiro (mRNA) e/ou de proteínas e, sua formação ocorre a partir da memória de trabalho (ALBERINI; MILEKIC; TRONEL, 2006; BADDELEY; ANDERSON; EYSENCK, 2011; IZQUIERDO et al., 1998; KANDEL, 2001). Formam-se memórias de curta duração continuamente, visto que as mesmas são utilizadas para lembrar algo que aconteceu há algumas horas atrás e dar continuidade ao tempo presente (IZQUIERDO, 2011; SQUIRE; KANDEL, 2003). Por sua vez, as memórias de longa duração (LTM) duram muitas horas, dias ou meses e, quando perduram por muitos anos, costumam ser denominadas de memórias remotas. A formação desse tipo de memória requer síntese de mRNA e de novas proteínas, além da participação de diversas vias de sinalização vinculadas a esses processos (ABEL; KANDEL, 1998; ALBERINI; MILEKIC; TRONEL, 2006; ALBRIGHT; KANDEL; POSNER, 2000;

IZQUIERDO, 2011; KANDEL, 2001; LEES; JONES; KANDEL, 2000; MAYFORD; KANDEL, 1999; MCGAUGH, 2000).

Debateu-se, durante muitos anos, se a STM e a LTM eram processos consecutivos, isto é, se a STM era uma fase da LTM, ou se as mesmas eram processos independentes. Izquierdo e colaboradores (IZQUIERDO et al., 1998) demonstraram que alguns tratamentos farmacológicos são capazes de suprimir a STM sem interferir na formação da LTM. Desta forma, mesmo que estes sistemas de memória compartilhem algumas estruturas cerebrais para o seu processamento, tais como a região CA1 do hipocampo dorsal, o córtex entorrinal e o córtex parietal, eles são separados em algum grau (IZQUIERDO et al., 1999; QUEVEDO et al., 2003).

1.2 Formação, Manutenção e Modificação da Memória

Os processos que formam, mantêm e modificam uma memória são bastante complexos e altamente dinâmicos. Em um primeiro momento ocorre a fase de **aquisição**, na qual novas informações, habilidades ou experiências são adquiridas através da exposição a um estímulo (SQUIRE, 1987). Cabe aqui ressaltar que o aprendizado e a memória estão intimamente conectados (SQUIRE; KANDEL, 2003). Não há memória sem que antes ocorra o aprendizado, entretanto, nem todo aprendizado é capaz de formar uma memória. A diferença entre ambos é sutil. O aprendizado refere-se à aquisição de novos saberes ou novas capacidades, contudo, nem sempre armazena-se todas as informações aprendidas ao longo da vida, muitas são filtradas pelo nível de alerta, ansiedade e estado de ânimo (IZQUIERDO, 2011). As informações que são registradas pelo sistema nervoso central e, posteriormente podem ser lembradas, referem-se à memória (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2007; IZQUIERDO, 2011; SQUIRE; KANDEL, 2003).

Após a aquisição de uma nova informação, a mesma encontra-se em um estado lábil e frágil, sensível à incorporação de novos elementos, eventos traumáticos e diferentes tratamentos farmacológicos (DA SILVA et al., 2008; DUDAI, 1996; MYSKIW et al., 2008; SQUIRE; KANDEL, 2003; TAUBENFELD et al., 2001; TONEGAWA; MORRISSEY; KITAMURA, 2018). Através de um processo chamado **consolidação**, a informação recém-adquirida é convertida em um traço de memória estável e duradouro (ALBERINI; KANDEL, 2015; BADDELEY; ANDERSON; EYSENCK, 2011; DUDAI, 2004; GLICKMAN, 1961; HEBB, 1950; MCGAUGH, 1966, 2000).

A etapa de consolidação da memória vem sendo estudada por mais de um século (ALBERINI, 2005; DUDAI, 2004; MCGAUGH, 2000; MISANIN; MILLER; LEWIS, 1968). Durante este período, importantes descobertas foram realizadas, entre elas que a consolidação da memória requer a síntese de RNA e de proteínas; e que vias de sinalização envolvendo o íon cálcio, a molécula de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) também são necessárias para a consolidação de diversos tipos de memória (ALBERINI, 2005; DAVIS; SQUIRE, 1984; DUDAI, 1996; FLEXNER; FLEXNER; STELLAR, 1965; GOELET et al., 1986; MCGAUGH, 2000). Ainda, estudos abordando a inativação funcional ou a lesão direta de áreas cerebrais específicas demonstraram que a consolidação de diferentes tipos de memória requer a participação de regiões cerebrais distintas (AMBROGI LORENZINI et al., 1999; POLDRACK; PACKARD, 2003).

Inicialmente, a teoria da consolidação postulava que, uma vez consolidadas, as memórias encontravam-se estáveis e resistentes a interferências (ALBERINI, 2005; BAILEY; BARTSCH; KANDEL, 1996; NADER, 2015; SPEAR, 1973). Contudo, sabe-se atualmente que, mesmo consolidadas, as memórias tornam-se novamente lábeis e sensíveis a interferências quando evocadas (DEBIEC; LEDOUX; NADER, 2002; MILEKIC; ALBERINI, 2002; PRZYBYSLAWSKI; SARA, 1997; TONEGAWA; MORRISSEY; KITAMURA, 2018). O processo de **evocação** é também conhecido como reativação, lembrança ou recuperação, e envolve, portanto, a recordação de uma informação previamente armazenada, comprovando que o aprendizado realmente deu origem a uma memória (IZQUIERDO, 2011).

Para ser preservada, uma memória evocada deve ser submetida a um processo adicional de re-estabilização chamado **reconsolidação**, o qual requer uma fase adicional de síntese de proteínas (DEBIEC; LEDOUX; NADER, 2002; DUDAI, 2004; JUDGE; QUARTERMAIN, 1982; LEE, 2009; LEWIS, 1979; MACTUTUS; RICCIO; FERREK, 1979; MISANIN; MILLER; LEWIS, 1968; NADER; HARDT, 2009; NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000; SARA, 2000). Durante a reconsolidação, uma memória já consolidada pode ser fortalecida, enfraquecida ou atualizada, proporcionando a oportunidade de modificar o traço mnemônico original (BALDI; BUCHERELLI, 2015; DUDAI, 2002; SARA, 2000; SCHWABE; NADER; PRUESSNER, 2014).

Apesar da sua própria definição sugerir, diversos estudos demonstram que a reconsolidação não é uma simples repetição da consolidação, visto que o curso temporal de ambos é distinto e que eles requerem, mesmo que com algum grau de coincidência, a ativação de diferentes estruturas cerebrais e mecanismos moleculares (ALBERINI, 2005; ALBERINI;

LEDOUX, 2013; BALDI; BUCHERELLI, 2015; LEE; EVERITT; THOMAS, 2004; MACTUTUS; RICCIO; FERREK, 1979; TRONSON; TAYLOR, 2007).

A evocação de uma memória previamente consolidada também pode ser inibida, processo este denominado de **extinção** (IZQUIERDO, 2011; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; PAVLOV, 1927; RESCORLA, 2001). Apesar de representar um “desaparecimento comportamental”, a extinção não é sinônimo de esquecimento, é um processo ativo de aprendizagem decorrente da reexposição à informação e/ou situação na ausência do seu reforço, levando a formação de uma nova memória que se sobrepõe à original (DE CARVALHO MYSKIW et al., 2015; FIORENZA et al., 2011; SCHMIDT et al., 2015). Por tratar-se de um novo aprendizado, a formação da memória de extinção envolve mecanismos celulares e moleculares semelhantes àqueles inicialmente recrutados para a consolidação da memória original (MYERS; DAVIS, 2007; SZAPIRO et al., 2003; VIANNA et al., 2001). Diversos estudos têm demonstrado que a formação da memória de extinção requer a ativação dos receptores glutamatérgicos de N-metil-D-Aspartato (NMDA), podendo também ser modulada pelos receptores histaminérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos no hipocampo, amígdala basolateral (BLA) e córtex pré-frontal ventromedial (vmPFC), além de necessitar de síntese de proteínas nestas três estruturas logo após a sua aquisição (BURGOS-ROBLES et al., 2007; DE CARVALHO MYSKIW et al., 2014; FIORENZA et al., 2012; LAURENT; WESTBROOK, 2008; SZAPIRO et al., 2003).

A extinção é clinicamente conhecida como terapia de exposição, sendo amplamente utilizada para tratar distúrbios desencadeados pela evocação recorrente de memórias de medo, como a Síndrome do Pânico e o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (PTSD) (BECKETT, 2002; DAVIS et al., 2006; DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2013a; PIZZORUSSO, 2009; QUIRK et al., 2010; SCHMIDT et al., 2015). Nos últimos 30 anos, o PTSD foi reconhecido como o mais grave e prevalente transtorno motivado pelo medo, uma vez que ele impede que o indivíduo tenha uma vida normal (BECKETT, 2002; SHER; VILENS, 2010).

1.3 Memória de Medo

O medo é uma resposta defensiva que guia o comportamento de diversas espécies animais, sendo, portanto, essencial para a adaptação, manutenção e sobrevivência das mesmas (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016). O medo pode ser desencadeado por diversos estímulos, incluindo predadores, membros agressivos da mesma espécie e até mesmo

características do próprio ambiente, como a altura (SILVA; GROSS; GRÄFF, 2016). Esses estímulos induzem respostas defensivas que independem de experiências prévias ou de processos associativos. Esse tipo de resposta é conhecida por "medo inato" (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989).

Por sua vez, existem respostas defensivas que são decorrentes de um processo de aprendizagem, o qual pode inclusive envolver o medo inato (SILVA; GROSS; GRÄFF, 2016). Neste caso, a resposta defensiva é formada pela associação entre um estímulo causador de medo e um estímulo neutro. Este último pode ser, por exemplo, o contexto onde o estímulo causador de medo ocorreu. Quando o estímulo neutro por si só adquire a capacidade de induzir uma resposta defensiva, a mesma é denominada “medo condicionado” ou “medo aprendido” (LEDOUX, 2003, 2014; SINGEWALD et al., 2015). O medo condicionado é uma importante forma de aprendizagem e de memória, pois através dele as espécies animais aprendem a identificar eventos ameaçadores e reagir adequadamente frente aos mesmos. Entretanto, como já mencionado anteriormente, o medo condicionado também pode desencadear severos distúrbios psiquiátricos quando processado inadequadamente (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016).

A memória de medo é extremamente robusta, rica em detalhes e persiste por longos períodos. Isto se deve ao alto grau de excitação emocional presente após o processo de aquisição desse tipo de memória, o qual é capaz de facilitar a consolidação da mesma através de mudanças duradouras na rede neuronal (CAHILL; MCGAUGH, 1998; MCGAUGH, 2004, 2013; O'DONNELL; SEJNOWSKI, 2014; QUEVEDO et al., 2004).

A circuitaria da memória de medo envolve diversas regiões cerebrais, entre as quais destacam-se a amígdala e o hipocampo (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). Os núcleos basolateral e central da amígdala estão fortemente implicados na aquisição e expressão da memória de medo condicionado (CIOCCHI et al., 2010; EHRLICH et al., 2009; MAREN, 2001; PHILLIPS; LEDOUX, 1992), enquanto que o hipocampo desempenha um papel chave no processamento e na estabilização da memória de medo condicionado ao contexto (MCC) (ANAGNOSTARAS; GALE; FANSELOW, 2001; BALDI; BUCHERELLI, 2015; BIEDENKAPP; RUDY, 2009; DEBIEC; LEDOUX; NADER, 2002; MAREN; PHAN; LIBERZON, 2013; MCGAUGH, 2000), uma vez que é a região dorsal do hipocampo a responsável pela codificação dos elementos contextuais dessa memória (GREENOUGH WT, 2000; KHEIRBEK et al., 2013).

Apesar do papel fundamental das regiões acima mencionadas, sabe-se que o circuito cerebral da memória de MCC é bastante amplo e complexo, o qual requer a participação de

outras estruturas cerebrais. Estudos sugerem que o córtex pré-frontal medial auxilia no controle de diversos aspectos do comportamento de medo, incluindo regulação emocional (PITMAN et al., 2012), tomada de decisões (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012), responsividade à ameaças (WOOD; VER HOEF; KNIGHT, 2012) (Wood et al. 2012) e também codificação do contexto (HYMAN et al., 2012).

Os mecanismos moleculares e sistemas neuronais requeridos nos processos de consolidação, reconsolidação e extinção da memória de medo não são necessariamente idênticos, apesar de haver algum grau de coincidência entre eles (ALBERINI, 2005; LEE; EVERITT; THOMAS, 2004). Entre os muitos neurotransmissores envolvidos nas diferentes fases do processamento da memória de medo, o glutamato desempenha um papel chave indiscutível (FIORENZA et al., 2012; GRAYBEAL; KISELYCZNYK; HOLMES, 2012; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; RADULOVIC; REN; GAO, 2018). A atividade glutamatérgica favorece a transmissão sináptica e a ativação de proteínas quinases que, subsequentemente, promovem a expressão de genes imediatos e fatores neurotróficos, como o c-Fos e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), respectivamente (BRAMHAM; MESSAOUDI, 2005; GALLO et al., 2018; MÉNARD; GAUDREAU; QUIRION, 2015; NICIU et al., 2014; SHARP et al., 1995).

Quando um neurônio é ativado de forma intensa, ocorre a síntese de proteínas específicas. Estas, por sua vez, demandam a ativação de genes de expressão imediata, como por exemplo o c-Fos, o qual codifica a proteína nuclear de mesmo nome (GALLO et al., 2018; KACZMAREK, 1993). A proteína c-Fos funciona como um fator de transcrição, regulando a expressão de genes de resposta tardia e influenciando a fisiologia neuronal (PINAUD, 2004).

O aumento da expressão de c-Fos é amplamente utilizado como um indicador de atividade neuronal (KACZMAREK, 2000; NESTLER; KELZ; CHEN, 1999), isto porque inúmeras evidências demonstram que a expressão de c-Fos está aumentada em processos envolvendo aprendizagem e memória (ver revisão em GALLO et al., 2018). Sua ativação em regiões cerebrais cruciais para o processamento mnemônico é observada em diferentes paradigmas comportamentais. Estudos mostram um aumento da expressão de c-Fos no hipocampo e nos córtices pré-frontal e perirrinal em tarefas de memória envolvendo medo condicionado, reconhecimento de objetos e informações espaço-temporais (AGGLETON; BROWN; ALBASSER, 2012; ALBASSER; POIRIER; AGGLETON, 2010; BARBOSA et al., 2013; STREKALOVA et al., 2003). A ativação de c-Fos também foi demonstrada na amígdala após um condicionamento aversivo (MCGREGOR et al., 2004). Esses dados sugerem que a proteína c-Fos é um importante marcador de atividade neuronal, fornecendo informações de

extrema relevância a respeito das regiões cerebrais e populações neuronais ativadas durante o aprendizado e a memória (KACZMAREK, 1993).

A expressão de fatores neurotróficos também está intimamente relacionada ao processamento mnemônico. Dentre eles, o fator neurotrófico derivado do cérebro desempenha um papel chave na regulação de várias funções neuronais, como a neurogênese e a plasticidade sináptica (KELLER et al., 2010; LU; CHRISTIAN; LU, 2008). O BDNF é a neurotrofina mais abundante do sistema nervoso central (SNC), sendo amplamente distribuído em regiões cerebrais cruciais para a aprendizagem, memória e comportamento, como o hipocampo e a amígdala (GRATACÒS et al., 2007; SHIMIZU et al., 2003). O BDNF atua ligando-se, por exemplo, ao receptor de quinase B relacionado à tropomiosina (TrKB) e, assim, promove a ativação de importantes vias de sinalização envolvidas nos mecanismos de plasticidade neural, como a via da proteína quinase alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (LEAL; COMPRIDO; DUARTE, 2014; SOULÉ; MESSAOUDI; BRAMHAM, 2006; YOSHII; CONSTANTINE-PATON, 2010).

Alterações na expressão do BDNF podem reduzir a plasticidade neuronal e, portanto, dificultar a adaptação à eventos estressores, contribuindo para o desenvolvimento de diversas doenças neurológicas, como o transtorno bipolar, epilepsia e depressão (EGAN et al., 2003). De fato, Hauck e colaboradores (2010) observaram um aumento nos níveis do BDNF no soro de pacientes que haviam sofrido algum trauma recentes.

1.4 Sistema Serotoninérgico

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é uma monoamina bem caracterizada que atua como neurotransmissor/neuromodulador nas sinapses das células nervosas (CELADA; PUIG; ARTIGAS, 2013; PYTLIAK et al., 2011). Os neurônios serotoninérgicos têm origem nos núcleos da rafe e seus axônios chegam a diversas áreas corticais e límbicas, incluindo estruturas cerebrais como cerebelo, estriado, córtex frontal, hipotálamo, amígdala e, especialmente, hipocampo, locais nos quais a serotonina é liberada para atuar sobre os receptores pré e pós-sinápticos (ANDRADE; HAJ-DAHMANE, 2013; BERGER; GRAY; ROTH, 2009; BOCCHIO et al., 2016a; CELADA; PUIG; ARTIGAS, 2013).

Uma característica típica da sinalização serotoninérgica é sua notável complexidade, o que se deve, principalmente, à diversidade dos seus receptores. Até o momento, diversos subtipos de receptores 5-HT foram identificados e, classificados em sete famílias diferentes: 5-HT₁ (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}), 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}), 5-HT₃ (5-

HT_{3A}, 5-HT_{3B}), 5-HT₄, 5-HT₅ (5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}), 5-HT₆ e 5-HT₇ (BARNES; SHARP, 1999; CELADA; PUIG; ARTIGAS, 2013; HOMBERG, 2012; MENESES, 2015). Com exceção dos receptores 5-HT₃, que são canais iônicos, todos os demais receptores são acoplados a proteínas G, e sua ativação resulta principalmente em ações modulatórias nos neurônios que expressam esses receptores (CELADA; PUIG; ARTIGAS, 2013; YUN; RHIM, 2011). Em geral, os receptores de serotonina afetam diversos sistemas enzimáticos, incluindo a adenilato ciclase. Os receptores 5-HT₁ e 5-HT₅ inibem a síntese de cAMP, enquanto que os receptores 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇ a ativam. Por sua vez, os receptores 5-HT₂ atuam ativando a fosfolipase C e aumentando os níveis de cálcio intracelular (BARNES; SHARP, 1999; CIFARIELLO; POMPILI; GASBARRI, 2008).

A diversidade de receptores 5-HT permite um maior entendimento dos diferentes e complexos processos nos quais a serotonina está envolvida. Desde a sua descoberta, há mais de 60 anos atrás, o sistema serotoninérgico desperta o interesse de muitos pesquisadores (BERGER; GRAY; ROTH, 2009; RAPPORT; GREEN; PAGE, 1948), o que se deve a sua ampla aplicação terapêutica em diversas condições clínicas, como depressão, esquizofrenia, dependência, comportamentos antissociais, transtornos de ansiedade e de aprendizagem e memória (BERGER; GRAY; ROTH, 2009; MENESES, 2013, 2014; NORDQUIST; ORELAND, 2010). Substâncias moduladoras do sistema serotoninérgico são frequentemente utilizadas para tratar uma grande variedade de transtornos de ansiedade, os quais caracterizam-se pela presença de alguma anormalidade no processo de aquisição ou extinção de memórias de medo condicionadas (BAUER, 2015; GORMAN, 2003).

Continuamente surgem novos estudos relacionando o sistema serotoninérgico e o processamento mnemônico (MENESES; GASBARRI, 2016). Alguns destes associam a redução dos níveis cerebrais de 5-HT, através de uma dieta pobre em triptofano (precursor da serotonina), a alterações na memória declarativa em seres humanos (SAMBETH et al., 2007) e à prejuízos na memória de reconhecimento de objetos em roedores (LIEBEN et al., 2004). Outros trabalhos sugerem que o sistema serotoninérgico desempenha um importante papel na consolidação da memória de curta e longa duração (CIFARIELLO; POMPILI; GASBARRI, 2008; GASBARRI et al., 2008; MENESES, 2007; PEREZ-GARCIA; MENESES, 2009). Ainda, o transportador de serotonina e alguns receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇) parecem ser importantes marcadores neurais e/ou alvos terapêuticos associados aos déficits cognitivos presentes no envelhecimento e na Doença de Alzheimer (MENESES, 2015; PAPPATÀ; SALVATORE; POSTIGLIONE, 2008; RODRÍGUEZ; NORISTANI; VERKHRATSKY, 2012).

A região cerebral da amígdala, fundamental no processamento da memória de medo, é proeminentemente modulada pelo sistema serotoninérgico. Inibidores seletivos de recaptção da serotonina, bem como alterações genéticas e farmacológicas no transportador de serotonina (5-HTT), afetam a ativação da amígdala em resposta a estímulos emocionais (BIGOS et al., 2008; BOCCHIO et al., 2016b; GODLEWSKA et al., 2012; MURPHY et al., 2009). Alguns genes relacionados ao sistema serotoninérgico têm sido, inclusive, associados à reconsolidação da memória de medo em humanos (AGREN et al., 2012). Apesar das evidências acima citadas, o envolvimento da serotonina no processamento da memória de medo permanece pouco compreendido (BOCCHIO et al., 2016b).

Nos últimos anos, uma atenção especial vem sendo dada à importância funcional dos últimos receptores serotoninérgicos descobertos: 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇ (WESOŁOWSKA, 2002). Apesar do crescente número de estudos, o receptor 5-HT₅ ainda é o menos estudado dentre os receptores serotoninérgicos, visto que (i) não há agonistas específicos para o subtipo 5-HT_{5A} e, (ii) até o momento, não está estabelecido se o subtipo 5-HT_{5B} é expresso em seres humanos (GONZALEZ; CHÁVEZ-PASCACIO; MENESES, 2013; THOMAS, 2006). Sabe-se que o receptor 5-HT₅ encontra-se em áreas cerebrais fundamentais para a aprendizagem e memória, como o hipocampo e o córtex (KASSAI et al., 2012; THOMAS, 2006) e, que a memória de esquiva passiva envolve a expressão de diversos receptores serotoninérgicos nessas áreas, incluindo o 5-HT_{5A} (CAVALLARO, 2008). Outros estudos sugerem ainda que o bloqueio deste receptor é capaz de prejudicar a memória de curta e longa duração na tarefa de condicionamento Pavloviano (GONZALEZ; CHÁVEZ-PASCACIO; MENESES, 2013; VOLK et al., 2010).

Os receptores 5-HT₆ têm despertado o interesse dos pesquisadores devido às fortes evidências relacionando este receptor à aprendizagem e memória, bem como ao aumento significativo de agonistas e antagonistas seletivos para este receptor (MENESES, 2014). Além disso, reduções significativas nos níveis do receptor 5-HT₆ foram encontradas em áreas corticais do cérebro de pacientes com a Doença de Alzheimer (MITCHELL; NEUMAIER, 2005).

O bloqueio do receptor 5-HT₆ pode resultar em efeitos pró- ou anti-amnésicos em diferentes tipos de memória (BRANCHEK; BLACKBURN, 2000; KING; MARSDEN; FONE, 2008; MENESES, 2015). Grande parte dos estudos sugere que a cognição pode ser melhorada através do bloqueio dos receptores 5-HT₆ e, por esse motivo, os antagonistas deste receptor estão entre as terapias serotoninérgicas utilizadas para o tratamento dos sintomas da Doença de Alzheimer (MENESES, 2015; RAMIREZ et al., 2014). King e colaboradores (KING et al.,

2004) observaram que os antagonistas dos receptores 5-HT₆ facilitam a neurotransmissão colinérgica e glutamatérgica, revertendo a perda da memória induzida por escopolamina e antagonistas do receptor NMDA, respectivamente. No entanto, alguns trabalhos não foram capazes de reproduzir os dados acima, fato este que ainda permanece sem explicação (GRAVIUS et al., 2011; LINDNER et al., 2003; RUSSELL; DIAS, 2002). Com relação a memória de medo, os antagonistas Ro-4368554 e SB-258585 não foram capazes de impedir o comprometimento do medo condicionado induzido pelo antagonista do receptor colinérgico muscarínico escopolamina e, pelo antagonista dos receptores NMDA MK-801 (GRAVIUS et al., 2011).

Em virtude da alta afinidade de diversos antipsicóticos e antidepressivos pelo receptor 5-HT₇, bem como a sua ampla distribuição em regiões cerebrais relevantes para aprendizagem e memória, pensa-se que o mesmo possa estar envolvido em diversos processos patológicos do SNC (ROBERTS; HEDLUND, 2012). Contudo, a escassez de estudos sobre a participação do deste receptor na aprendizagem, sobretudo emocional, é devida principalmente à falta de ligantes seletivos, especialmente agonistas (LEOPOLDO, 2004; LEOPOLDO et al., 2011; MISANE; OGREN, 2000; STIEDL et al., 2015).

Estudos sugerem que o receptor 5-HT₇ possui um papel extremamente relevante na formação das memórias (ERIKSSON et al., 2008; LIY-SALMERON; MENESES, 2007; MENESES, 2004; PÉREZ-GARCÍA; GONZALEZ-ESPINOSA; MENESES, 2006; PEREZ-GARCÍA; MENESES, 2005; ROBERTS et al., 2004; SARKISYAN; HEDLUND, 2009). Alguns trabalhos relatam que a inativação deste receptor leva causa um prejuízo na consolidação da memória de medo (OHMURA et al., 2016; ROBERTS et al., 2004a). Gasbarri e colaboradores (GASBARRI et al., 2008) demonstraram que o bloqueio do receptor 5-HT₇, em tarefas de aprendizado com algo grau de dificuldade, resulta em efeitos pró-cognitivos. Corroborando com esta hipótese, observou-se que o antagonista seletivo SB-269970 foi capaz de estimular a liberação de glutamato e impedir os *déficits* causados na memória de trabalho por um antagonista do receptor NMDA. Estes resultados indicam que o bloqueio do receptor 5-HT₇ pode reverter *déficits* cognitivos associados com a disfunção do sistema glutamatérgico (BONAVENTURE et al., 2011; SINGEWALD et al., 2015).

1.5 Enzimas Anidrases Carbônicas

As anidrases carbônicas (AC) são um grande grupo de enzimas que catalisam a conversão reversível de dióxido de carbono (CO₂) e água em bicarbonato (HCO₃⁻) e prótons

(H⁺) (GILMOUR, 2010; MELDRUM; ROUGHTON, 1933; SUPURAN; SCOZZAFAVA; CASINI, 2003). Sem a presença das mesmas, essa reação ocorreria de forma muito lenta e não conseguiria satisfazer as necessidades metabólicas de um organismo (SUPURAN, 2017). Por serem metaloenzimas, as AC são cataliticamente efetivas somente na presença de um íon metálico no interior do seu sítio ativo. Geralmente, o íon utilizado pelas AC é o zinco (Zn²⁺), o qual é responsável por coordenar as ligações da molécula de H₂O e gerar, a partir dela, uma hidroxila e um próton que, posteriormente, serão adicionados ao CO₂ para dar origem a molécula de HCO₃⁻ (GILMOUR, 2010; LINDSKOG, 1997; LINDSKOG; SILVERMAN, 2000).

Os substratos utilizados e os produtos gerados na reação acima são moléculas e íons simples, porém, indispensáveis na fisiologia de diversos sistemas (SUPURAN, 2016a). Por essa razão, as anidrases carbônicas exercem um papel crucial em importantes processos, como respiração, transporte de CO₂ e bicarbonato entre tecidos e pulmões, regulação do pH sanguíneo, secreção eletrolítica em vários órgãos e tecidos, reações biossintéticas (como glicogênese, lipogênese e ureogênese), reabsorção óssea, calcificação e tumorigenicidade (SUPURAN, 2008).

Até o momento, seis famílias de anidrases carbônicas foram identificadas, sendo que a família α é a única presente nos animais vertebrados. Nos mamíferos, 16 isoformas α -AC são conhecidas, com atividade catalítica, localização celular e distribuição diferentes (SUPURAN, 2008, 2016b). As α -AC intracelulares incluem 5 isoformas citosólicas (I, II, III, VII e XIII) e 2 mitocondriais (V_A e V_B), enquanto que as α -AC extracelulares compreendem 5 isoformas associadas à membrana (IV, IX, XII, XIV e XV) e uma isoforma que é secretada no meio extracelular (VI). Além disso, há três isoformas (VIII, X e XI) denominadas proteínas relacionadas à anidrase carbônica (CARPs) que não apresentam um metal no seu centro ativo e, portanto, não possuem atividade catalítica (GILMOUR, 2010; IMTAIYAZ HASSAN et al., 2013; SUPURAN, 2008).

As α -AC são encontradas, praticamente, em todos os tecidos, entretanto, há isoformas com localização específica. Algumas α -AC são expressas no sistema nervoso central, onde cada uma delas possui um padrão característico de distribuição (PARKKILA et al., 2001): a AC II está presente nos astrócitos (CAMMER; TANSEY, 1988; KIMELBERG; STIEG; MAZURKIEWICZ, 1982) e oligodendrócitos (GHANDOUR et al., 1980; KUMPULAINEN; KORHONEN, 1982); a AC IV nas células endoteliais do cérebro (GHANDOUR et al., 1992); a AC V nos astrócitos e neurônios (GHANDOUR et al., 2000); a AC VII em todo o sistema

nervoso central (IMTAIYAZ HASSAN et al., 2013). Por sua vez, a AC XIV e as CARPs são amplamente expressas no cérebro (GILMOUR, 2010; IMTAIYAZ HASSAN et al., 2013).

As anidrases carbônicas são conhecidas na prática clínica devido a ação diurética de seus inibidores, embora atualmente os mesmos não sejam mais utilizados para esta finalidade (BAYNES; DOMINICZAK, 2015; KATZUNG; VOEUX; SILVA, 2006). No decorrer dos últimos anos, os inibidores das AC têm sido propostos como alvos terapêuticos para o tratamento de uma série de condições clínicas, como glaucoma, obesidade, câncer, epilepsia e osteoporose (SUPURAN, 2008, 2016b).

Os inibidores mais potentes e importantes das anidrases carbônicas pertencem à classe das sulfonamidas (SUPURAN, 2012). Entre eles, destaca-se o composto acetazolamida, (ACTZ), o qual possui uma alta afinidade pelas isoformas II, IV, V, VII e IX (SUPURAN; SCOZZAFAVA; CASINI, 2003) e parece ser extremamente efetivo no tratamento da epilepsia (REISS; OLES, 1996) e do glaucoma (KAUR et al., 2002).

No processamento mnemônico, o papel das anidrases carbônicas ainda é pouco investigado. Sabe-se que ocorre uma redução das mesmas no cérebro durante o envelhecimento (MEIER-RUGE et al., 1980), diminuição esta que é mais severa nos pacientes com a Doença de Alzheimer (MEIER-RUGE; IWANGOFF; REICHLMEIER, 1984). Outras evidências sugerem que as AC desempenham um papel chave nos processos de aprendizagem e memória. Estudos demonstraram que o inibidor acetazolamida prejudica a consolidação da memória de medo (YANG et al., 2013) inibindo a fosforilação das kinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) na amígdala. Por sua vez, o ativador D-fenilalanina (D-Phe) melhora a consolidação da memória espacial (SUN; ALKON, 2001) e, também, da memória de reconhecimento de objetos (CANTO DE SOUZA et al., 2017), nesta última através da fosforilação das ERK1 e ERK2 no córtex e no hipocampo. Além disso, há relatos de que compostos de extrema relevância para a memória, como histamina, serotonina e catecolaminas, atuam como eficientes ativadores das anidrases carbônicas (ILIES et al., 2002; SCOZZAFAVA; IORGA; SUPURAN, 2000).

Em conjunto, todas as evidências acima sugerem que a ativação das AC aumenta a eficácia sináptica e que, portanto, compostos capazes de ativar este grupo de enzimas seriam excelentes alvos para o tratamento de condições clínicas onde o aprendizado e a memória estão prejudicados (SCOZZAFAVA; SUPURAN, 2002a, 2002b). Apesar disto, ativadores das AC são menos estudados que os seus inibidores, provavelmente porque as anidrases carbônicas já possuem uma atividade enzimática extremamente eficiente (SUPURAN; SCOZZAFAVA; CONWAY, 2004; TEMPERINI; SCOZZAFAVA; SUPURAN, 2008).

1.6 Estresse Social

O termo estresse foi introduzido no meio médico e científico pelo pesquisador Hans Selye no ano de 1936. Seus estudos demonstraram que um organismo é capaz de gerar uma série de respostas fisiológicas inespecíficas quando submetido à estímulos estressores que perturbam o seu equilíbrio dinâmico (CHROUSOS; GOLD, 1992; SELYE, 1936; SZABO et al., 2017). Atualmente, sabe-se que as respostas fisiológicas ao estresse apresentam um certo grau de especificidade em relação ao fator estressor que as gera, entretanto, essa especificidade diminui progressivamente à medida que aumenta a gravidade do estímulo estressor (KOOLHAAS et al., 2011; TSIGOS; CHROUSOS, 2002).

A resposta ao estresse é modulada por vários fatores, como tipologia, duração, previsibilidade e intensidade do estímulo estressor (JOHNSON et al., 1992). Enquanto as alterações fisiológicas em resposta a estímulos estressores breves e suaves são capazes de promover a restauração da homeostasia, a exposição a fatores estressores de maior magnitude podem ocasionar efeitos deletérios ao organismo, entre eles disfunções do sistema imune e oxidativo, processos de morte e proliferação celular, além de déficits cognitivos e mnemônicos (FUCHS et al., 2001; SORRELLS; SAPOLSKY, 2007). Estes efeitos manifestam-se, muitas vezes, através de severas patologias, como doenças cardiovasculares, infecções, artrite, fibromialgia, câncer e transtornos psiquiátricos variados (SALVADOR; COSTA, 2009; SAPOLSKY, 2000).

Nos seres humanos e outros vertebrados, a resposta ao estresse envolve, principalmente, a ativação do Sistema Nervoso Autônomo, com liberação de adrenalina e noradrenalina, bem como a ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA), resultando na liberação de glicocorticoides (GOOSENS; SAPOLSKY, 2007; TSIGOS; CHROUSOS, 2002). Estes hormônios são potentes moduladores da fisiologia celular e do comportamento, por esse motivo, durante o estresse, o nível de atenção aumenta e o cérebro concentra-se na ameaça recebida; a frequência cardíaca e respiratória também aumentam; o catabolismo é maior e o fluxo sanguíneo é redirecionado para fornecer mais energia para o cérebro, coração e músculos (CHROUSOS; GOLD, 1992; GOOSENS; SAPOLSKY, 2007; SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000; TSIGOS; CHROUSOS, 2002). Além disso, os hormônios glicocorticoides modulam os sistemas de aprendizagem e memória, por esse motivo, são considerados importantes reguladores do processamento mnemônico (MCEWEN, 2012). Durante períodos de transições biológicas, como o período de transição da adolescência para a idade adulta, o

sistema nervoso central é mais vulnerável a estressores crônicos e à altas concentrações de glicocorticóides (BURKE et al., 2017).

O sistema HPA está fortemente interligado a outros elementos do sistema nervoso central envolvidos na regulação do comportamento e da emoção (JOHNSON et al., 1992). O hipocampo, estrutura chave nos processos de aprendizagem e memória, possui uma elevada concentração de receptores glicocorticóides, exercendo efeitos inibitórios sobre o eixo HPA e, assim, modulando a resposta ao estresse (DASKALAKIS et al., 2015; FUCHS et al., 2001; KIM; PELLMAN; KIM, 2015). Apesar do hipocampo representar uma das estruturas cerebrais mais importantes na mediação da resposta ao estresse, o córtex pré-frontal também desempenha um papel extremamente relevante na integração de informações cognitivas e emocionais (ARULSAMY et al., 2018; GORDON et al., 2002, 2003; SHIRAZI et al., 2015).

Estruturas cerebrais relacionadas à motivação e recompensa (hipotálamo e corpo estriado ventral), bem como aquelas associadas à regulação emocional e controle motor (amígdala e estriado dorsal), também estão envolvidas na resposta do organismo ao estresse, sobretudo ao estresse do tipo social (SIVIY; PANKSEPP, 2011; TREZZA; BAARENDSE; VANDERSCHUREN, 2010; VANDERSCHUREN; ACHTERBERG; TREZZA, 2016). Em conjunto, todas essas regiões formam uma interface entre estruturas límbicas e corticais que controlam o processamento da informação a regulação da atividade do eixo HPA frente à estímulos estressores (SHIRAZI et al., 2015).

A busca pelo entendimento da complexa rede de alterações fisiológicas provocadas pelo estresse tem sido um grande desafio para os pesquisadores. Sabe-se que as pressões sociais, psicológicas e econômicas da sociedade moderna estão fortemente relacionadas com a incidência de diversas patologias (GOÑI-BALENTZIAGA et al., 2018; NUNFAM et al., 2018). Entre os fatores estressores mais comuns vivenciados pelo homem destacam-se os de natureza social. Competições, desentendimentos e a permanência em um ambiente hostil são alguns exemplos de estressores sociais presentes na rotina de muitos indivíduos (BLANCHARD; MCKITTRICK; BLANCHARD, 2001). Por essa razão, modelos animais submetidos à estressores sociais são capazes de simular de forma muito eficiente os desafios encontrados pelo homem em seu ambiente natural, fornecendo informações mais precisas acerca das respostas fisiológicas e comportamentais emitidas pelo organismo humano (HUHMAN, 2006; TAMASHIRO; NGUYEN; SAKAI, 2005).

A experiência social durante a adolescência, a qual inclui brincadeiras com pares do mesmo sexo, é crucial para o desenvolvimento social, emocional e cognitivo do indivíduo. A

exposição a um estresse do tipo social nessa fase pode desencadear severos problemas à saúde, inclusive, na vida adulta (BURKE et al., 2017; BUWALDA et al., 2011).

Visto que a adolescência é uma fase de extrema importância para o desenvolvimento de diversos comportamentos sociais, estímulos estressores desse gênero podem prejudicá-los (HODGES; BAUMBACH; MCCORMICK, 2018). Além disso, eventos estressores precoces aumentam a probabilidade de o indivíduo desenvolver transtornos psiquiátricos e dependência à substâncias psicoativas na vida adulta (ANDERSEN; TEICHER, 2008; GUTMAN; NEMEROFF, 2003; SCHELLER- GILKEY et al., 2003).

Evidências demonstram que regiões cerebrais necessárias para a interação social, como o septo lateral, a amígdala medial e o hipocampo, sofrem alterações funcionais e morfológicas na adolescência (DE VRIES; BUIJS; SWAAB, 1981). Nesse período, o estresse social altera a função serotoninérgica em diferentes regiões cerebrais, o que explica os fenótipos comportamentais ansiosos e depressivos observados em sujeitos expostos a fatores estressores sociais durante o período de formação (BURKE et al., 2017).

O estresse do tipo social na adolescência também modula de maneira negativa os processos de aprendizagem e memória. Observou-se que animais submetidos a isolamento no período da adolescência, isto é, que passaram menos tempo interagindo com um par, demonstraram prejuízos significativos na memória de reconhecimento social (SHAHAR-GOLD; GUR; WAGNER, 2013). Ainda, evidências demonstram que fatores estressores sociais na adolescência ocasionam déficits na memória de medo em animais adultos (MORRISSEY; MATHEWS; MCCORMICK, 2011).

1.7 Vitamina A e Ácidos Graxos Ômega-3

A nutrição é um dos principais fatores ambientais que pode interferir na função cognitiva e na saúde mental (PARLETTA; MILTE; MEYER, 2013). Nutrientes como ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e antioxidantes como a vitamina A são extremamente importantes para diversas funções cerebrais, em todas as fases da vida (BODNAR; WISNER, 2005; LÉTONDOR et al., 2016).

Os ácidos graxos poliinsaturados são um tipo de gordura caracterizada pela presença de duas ou mais ligações duplas (insaturações) entre os carbonos da sua cadeia (ALESSANDRI et al., 2004). São classificados em ômega-3 e ômega-6 pois apresentam, respectivamente, a primeira insaturação a partir do grupamento metil no terceiro e sexto carbono da molécula (DYALL; MICHAEL-TITUS, 2008). Os PUFAs são considerados ácidos graxos essenciais

pois não podem ser sintetizados endogenamente, sendo essencial a obtenção dos mesmos através do consumo de alimentos ou suplementos que apresentem essas gorduras em sua composição (YEHUDA et al., 2002; YODIM; MARTIN; JOSEPH, 2000).

Os ácidos graxos ômega-3 compreendem o ácido de cadeia curta alfa-linolênico (ALA) e os ácidos de cadeia longa eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) (DYALL, 2015). Após ingerido, o ácido alfa-linolênico pode ser convertido em EPA e, na sequência, em DHA, porém de uma maneira pouco eficiente em virtude do alto esforço metabólico a ser desempenhado pelo organismo. Desta forma, a absorção de EPA e DHA é maior quando o seu consumo se dá diretamente através da alimentação (BODNAR; WISNER, 2005; YODIM; MARTIN; JOSEPH, 2000).

Ao se comparar as fontes de ômega-3, é importante salientar que fontes marinhas, especialmente peixes, são os principais fornecedores de EPA e DHA, enquanto fontes vegetais, como a linhaça, são responsáveis pelo fornecimento de ALA (ALESSANDRI et al., 2004). Diferentemente da dieta mediterrânea, a qual é abundante em EPA e DHA, a dieta ocidental é caracterizada pelo consumo de alimentos com alto valor energético e baixo valor nutricional (PARLETTA; MILTE; MEYER, 2013)

EPA e DHA desempenham uma relevante função na manutenção do equilíbrio de diversos processos fisiológicos, sendo necessários para a saúde dos sistemas cardíaco, ocular e cerebral (BOZZATELLO et al., 2016; WAITZBERG; GARLA, 2014). Esses ácidos graxos são importantes componentes estruturais das membranas celulares, exercendo, portanto, um papel fundamental na formação, desenvolvimento e controle das propriedades biofísicas das mesmas (BODNAR; WISNER, 2005). Tais atribuições permitem que EPA e DHA regulem a funcionalidade de diversos neurotransmissores e, assim, também a transmissão do impulso nervoso entre as células (BODNAR; WISNER, 2005; SALEM et al., 2001). O DHA é o PUFA mais proeminente no cérebro, onde é capaz de aumentar a sensibilidade de diversos receptores, como por exemplo os serotoninérgicos (HIBBELN; SALEM, 1995).

Estudos demonstram que EPA e DHA estão particularmente envolvidos na manutenção das funções cognitivas, sobretudo durante o envelhecimento (JOFFRE et al., 2014; SU, 2010). O declínio cognitivo frequentemente observado nesse período da vida tem sido associado a uma diminuição cerebral de EPA e DHA (DYALL; MICHAEL; MICHAEL-TITUS, 2010; LABROUSSE et al., 2012). Corroborando com essas informações, existem evidências de que uma dieta suplementada com esses nutrientes é capaz de melhorar diferentes aspectos da memória em animais idosos (WATSON; MEESTER, 2014).

A relação da microbiota intestinal com as funções cerebrais vem sendo crescentemente investigada. Estudos sugerem que os PUFAs EPA e DHA são essenciais para a regulação da memória do medo (MATHIEU et al., 2011; MCNAMARA; CARLSON, 2006; NOGUCHI et al., 2017; ROSS, 2009). Evidências mostram que EPA e DHA poderiam melhorar o processamento anormal da memória do medo através do aumento da expressão do BDNF, levando à neurogênese, modulação da transdução de sinal e normalização do eixo Microbiota-Intestino-Cérebro (BELTZ et al., 2007; DELL'OSSO et al., 2009; OKUBO et al., 2018; WU; YING; GOMEZ-PINILLA, 2004).

Outro nutriente considerado essencial é a vitamina A. Esse composto é particularmente importante para a manutenção do equilíbrio de diversos processos fisiológicos, incluindo a morfogênese, visão e reprodução (MADEN; GALE; ZILE, 1998). Seu papel nas fases iniciais da vida é extremamente relevante, sobretudo no desenvolvimento cerebral nos períodos embrionário e neonatal (LANE; BAILEY, 2005; OLSON; MELLO, 2010). Sua ausência, ou reduzida ingestão, pode causar danos significativos à saúde, inclusive na infância tardia e na idade adulta (MEY; MCCAFFERY, 2004; STONEY; MCCAFFERY, 2016).

Entre os derivados de vitamina A, denominados retinóides, destacam-se o retinol e o ácido retinóico (AR). O retinol é o principal composto obtido através da dieta, sendo o precursor primário dos demais retinóides (LANE; BAILEY, 2005). Por sua vez, o ácido retinóico é o principal e mais abundante metabólito da vitamina A, sendo fundamental para a neuroplasticidade de diversas regiões cerebrais, especialmente no hipocampo (DRÄGER, 2006; ETCHAMENDY et al., 2001; MCCAFFERY; ZHANG; CRANDALL, 2006). A ação do ácido retinóico se dá, principalmente, através da sua ligação a dois tipos de receptores nucleares, o receptor de ácido retinóico (RAR) e o receptor retinóide X (RXR). RAR e RXR atuam como fatores de transcrição ligante-dependentes, modulando a expressão dos genes responsivos ao ácido retinóico (ETCHAMENDY et al., 2001; LÉTONDOR et al., 2016).

A participação deste metabólito nos processos de aprendizagem e memória vem sendo crescentemente estudada. Déficits mnemônicos associados ao envelhecimento parecem estar relacionados à hipoativação da via de sinalização do ácido retinóico (BONHOMME et al., 2014; DYALL; MICHAEL; MICHAEL-TITUS, 2010; MINGAUD et al., 2008). Além disso, há relatos de que a administração subcutânea de AR foi capaz de melhorar a memória espacial de animais idosos, restaurando a expressão dos receptores RAR e RXR e de marcadores de plasticidade sináptica no hipocampo (ETCHAMENDY et al., 2001). De maneira semelhante, demonstrou-se que a diminuição na expressão de RAR e RXR no prosencéfalo e na região hipocampal de animais idosos foi revertida através de uma suplementação com ácidos graxos

EPA e DHA (DYALL; MICHAEL; MICHAEL-TITUS, 2010). Este último achado indica, fortemente, que EPA e DHA também regulam a expressão gênica no cérebro através de ligações aos receptores nucleares RAR e RXR (LÉTONDOR et al., 2016).

EPA/DHA e AR também possuem efeitos extra nucleares e não transcricionais, uma vez que são capazes de ativar vias de sinalização mediadas por proteínas quinases, como a proteína quinase B ou as MAP quinases, influenciando assim a expressão gênica através de processos de fosforilação (AL TANOURY; PISKUNOV; ROCHETTE-EGLY, 2013; MASIÁ et al., 2007; RAO et al., 2007). Recentemente, observou-se que a cálcio-calmodulina quinase II também pode ser modulada por EPA/DHA e AR (MA; LI; TSIEN, 2015). Entre as muitas quinases expressas no cérebro mamífero, as quinases acima citadas estão particularmente envolvidas na neuroplasticidade (GIESE; MIZUNO, 2013).

As evidências acima demonstram a existência de uma estreita relação entre os PUFAs EPA/DHA e o ácido retinóico, sugerindo que esses três nutrientes podem atuar em conjunto afim de modular a transmissão sináptica e, portanto, os processos de aprendizagem e memória (ETCHAMENDY et al., 2001).

2 JUSTIFICATIVA

A memória de medo talvez seja uma das memórias mais estudadas, visto que ela é de extrema importância para a sobrevivência, bem-estar e adaptação dos seres vivos. Apesar de todo o conhecimento adquirido até o momento com relação ao processamento da memória de medo, existem ainda importantes lacunas com relação às diferentes fases dessa memória e os elementos acima abordados (BALDI; BUCHERELLI, 2015; TRONSON; TAYLOR, 2007). Compreender os circuitos neurais e moleculares subjacentes aos processos de consolidação, reconsolidação e extinção deste tipo de memória pode ter uma relevância clínica no tratamento de distúrbios de ansiedade e de medo em humanos, como a Síndrome do Pânico e o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (BALDI; BUCHERELLI, 2015; SCHWABE; NADER; PRUESSNER, 2014).

Nesse contexto, o sistema serotoninérgico permanece ainda pouco estudado. Apesar do interesse que o mesmo desperta desde a descoberta da serotonina, apenas nos últimos anos a importância funcional de alguns receptores serotoninérgicos recebeu atenção especial. Um crescente número de estudos sugere o envolvimento destes receptores na aprendizagem e memória (GONZALEZ; CHÁVEZ-PASCACIO; MENESES, 2013; MENESES, 2013, 2014, 2015; THOMAS, 2006), no entanto, até o momento, não se investigou a participação dos

receptores 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ da região hipocampal nos processos de consolidação e reconsolidação da memória de medo. Além disso, verificar o envolvimento desses receptores nos processos de estabilização da memória de medo permite ainda a ampliação dos conhecimentos acerca das diferenças e similaridades entre consolidação e reconsolidação, uma vez que nem todos os substratos neurais subjacentes à formação de uma memória, a modulam após a sua reativação (ALBERINI, 2005).

Igualmente pouco estudado é o envolvimento das enzimas anidrases carbônicas no processamento mnemônico. Sabe-se que este grupo de enzimas está relacionado a uma série de condições clínicas, e que compostos capazes de modular a atividade das AC têm sido sugeridos para o tratamento de algumas patologias, como a epilepsia e o glaucoma. Recentes evidências sugerem que as anidrases carbônicas desempenham um importante papel na aprendizagem e na memória, atuando, inclusive, na consolidação da memória de medo (YANG et al., 2013). Apesar disso, o envolvimento das AC no processo de extinção dessa memória jamais foi estudado.

Em contrapartida, há um crescente número de investigações acerca dos efeitos do estresse sobre a fisiologia de diversos sistemas. Isto se deve ao fato do estresse ser um dos grandes problemas da sociedade moderna do século XXI, bem como às inúmeras complicações que o estresse causa à saúde do indivíduo (KUDIENKA; WÜST, 2010). O estresse de natureza social é um dos principais responsáveis por alterações no sistema imune, oxidativo, déficits cognitivos e mnemônicos. Evidências mostram que o estresse de instabilidade social pode interferir no processamento da memória de medo (MCCORMICK; MONGILLO; SIMONE, 2013; MORRISSEY; MATHEWS; MCCORMICK, 2011), contudo, os seus efeitos sobre a consolidação dessa memória em diferentes fases da vida, bem como formas acessíveis e não medicamentosas de prevenir tais efeitos, permanecem por serem melhor investigados.

***CAPÍTULO II:
MODULAÇÃO DA CONSOLIDAÇÃO E RECONSOLIDAÇÃO
DA MEMÓRIA DE MEDO AO CONTEXTO ATRAVÉS DOS
RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇***

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Investigar o envolvimento da neurotransmissão serotoninérgica nas fases de estabilização da memória de medo condicionado ao contexto.

1.2 Objetivos específicos

Verificar a participação dos receptores 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ da região CA1 do hipocampo dorsal no processo de consolidação da memória de medo condicionado ao contexto.

Verificar a participação dos receptores 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ da região CA1 do hipocampo dorsal no processo de reconsolidação da memória de medo condicionado ao contexto.

2 MÉTODOS

2.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos CrlCembe: WI machos com cerca de três meses de idade, pesando em média 300 g, provenientes do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) da PUCRS. Os animais foram mantidos em caixas plásticas especiais, forradas com maravalha e com capacidade para até 4 animais. Os mesmos foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas (luz a partir das 7:00 horas e escuro a partir das 19:00 horas), com água e comida a vontade e temperatura ambiente constante de 23°C. Todos os procedimentos foram realizados somente após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da PUCRS, sob o registro CEUA 14/00395 e, estiveram de acordo com as normas da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica do CONCEA.

2.2 Cirurgia esterotóxica

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotóxica para implantação de cânulas guia de 0,2 mm de calibre, posicionadas 1,0 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal (CA1;

A -4.2, L \pm 3.0, V -1.8 mm), segundo o atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS, 1986). Todo o procedimento de cirurgia estereotáxica foi realizado com os animais previamente anestesiados com ketamina e xilazina, ambos administrados intra-peritonealmente (i.p.) nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente. Os procedimentos comportamentais foram realizados após 7 dias da cirurgia estereotáxica, para completa recuperação dos animais experimentais.

2.3 Manipulação dos animais experimentais

Nos três dias que antecederam os experimentos comportamentais, os animais foram submetidos a uma sessão diária de manipulação. Durante cada sessão, os animais foram retirados da caixa moradia e manuseados durante 2 minutos (min). Após 24 horas da última sessão de manipulação, os animais foram submetidos ao paradigma comportamental de medo condicionado ao contexto.

2.4 Condicionamento Clássico

O condicionamento clássico representa um excelente modelo para o estudo das diferentes fases do processamento da memória de medo condicionado ao contexto. Também conhecido como condicionamento Pavloviano, o mesmo foi primeiramente proposto no início do século XX pelo fisiologista e médico russo Ivan Pavlov. Essa forma de aprendizagem baseia-se no fato de que muitas memórias, sobretudo as memórias de medo, são adquiridas por meio da associação entre diferentes estímulos (MAREN, 2001; PAVLOV, 1927). O treinamento do condicionamento clássico consiste no pareamento de um estímulo inicialmente neutro (CS) com um estímulo significativo (US). A apresentação desse pareamento por algumas vezes gera uma resposta condicionada, evidenciando que a associação entre o CS e o US foi aprendida (IZQUIERDO, 2011; PAVLOV, 1927; VANELZAKKER et al., 2014).

Para o estudo da memória de medo condicionado ao contexto, utilizou-se no presente trabalho a tarefa comportamental de mesmo nome, a qual baseia-se no condicionamento clássico de Pavlov. Neste paradigma, o estímulo condicionado é representado por uma caixa, nomeada caixa de condicionamento, sendo que o estímulo incondicionado é determinado pela apresentação de um estímulo elétrico (BUCCAFUSCO, 2009; MAREN, 2001). O pareamento desses dois estímulos, apresentado repetidamente, dá origem a uma resposta condicionada quando ocorre a apresentação do CS, na ausência do US. Essa resposta denomina-se freezing e é representada pelo tempo total em que o animal permanece completamente imóvel, exceto

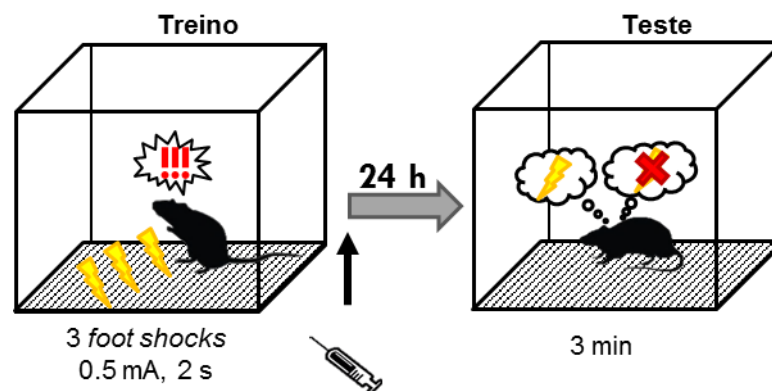
pelos seus movimentos respiratórios (RUDY; HUFF; MATUS-AMAT, 2004; TRONSON; TAYLOR, 2007).

Para a realização da tarefa comportamental de medo condicionado ao contexto (MCC), foi utilizado um aparato denominado *Startle and Fear Combined System* (Panlab®). Este consiste em uma caixa de condicionamento (35 x 35 x 35 cm) cujas paredes são de alumínio, a parte frontal de acrílico transparente e, o assoalho é constituído por barras metálicas que conduzem corrente elétrica. A caixa de condicionamento está acoplada a um microcomputador que possui o *software PACKWIN* (Panlab®) específico para a realização da tarefa de medo condicionado ao contexto, o qual foi previamente programado de acordo com o protocolo experimental utilizado.

2.4.1 Protocolo de consolidação da memória de MCC

No dia 1 (sessão de treino), os animais foram colocados individualmente na caixa de condicionamento e, após um período de 120 s, receberam 3 estímulos elétricos (0.5 mA, 2 s) nas patas, em intervalos de 30 s cada. Trinta segundos após o último estímulo elétrico, os animais foram retirados do aparato e infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal (1 µl/lado) com um dos diferentes tratamentos farmacológicos. Vinte e quatro horas depois (dia 2), os animais foram submetidos a um teste de retenção (Figura 1), no qual foram recolocados na caixa de condicionamento por 180 s, na ausência do estímulo elétrico. O tempo total de *freezing* do animal foi medido como resposta condicionada durante os primeiros 120 s da sessão de treino e durante o teste de retenção (FIORENZA et al., 2012).

Figura 1: Esquema ilustrativo do protocolo de consolidação da memória de MCC

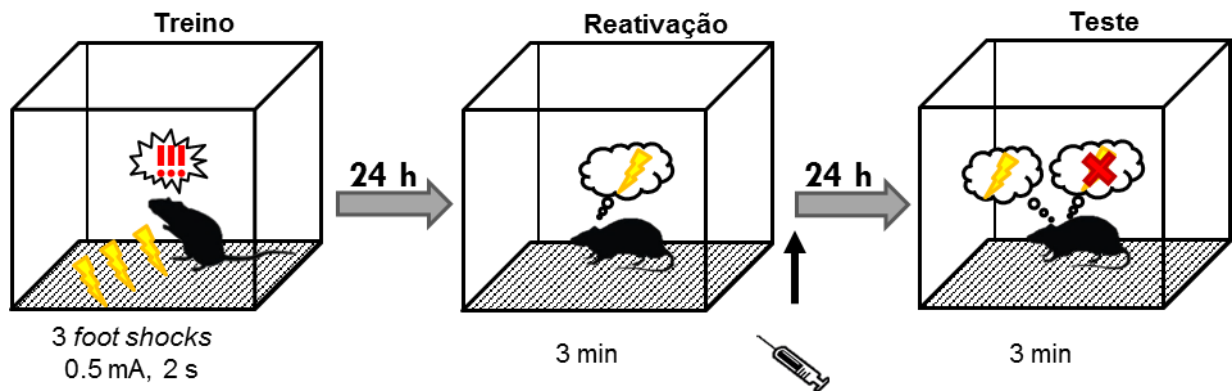


Fonte: O autor (2018)

2.4.2 Protocolo de reconsolidação da memória de MCC

No dia 1 (sessão de treino), os animais foram colocados individualmente na caixa de condicionamento e, após um período de 120 s, receberam 3 estímulos elétricos (0.5 mA, 2 s) nas patas, em intervalos de 30 s cada. Trinta segundos após o último estímulo elétrico, os animais foram retirados do aparato e recolocados na caixa moradia. Vinte e quatro horas depois (dia 2), os animais foram novamente colocados na caixa de condicionamento por 180 s para uma sessão de reativação, na ausência do estímulo elétrico. Ao término da sessão, os mesmos foram retirados do aparato e, imediatamente ou 3 h após a sessão de reativação, receberam um dos diferentes tratamentos farmacológicos intra-CA1 do hipocampo (1 μ l/lado). No dia 3 (teste de retenção), os animais foram recolocados na caixa de condicionamento pelo período de 180 s (Figura 2), também na ausência do estímulo elétrico. O tempo total de *freezing* do animal foi medido como resposta condicionada durante os primeiros 120 s da sessão de treino e durante sessão de reativação e teste de retenção.

Figura 2: Esquema ilustrativo do protocolo de reconsolidação da memória de MCC



Fonte: O autor (2018)

2.5 Intervenções farmacológicas

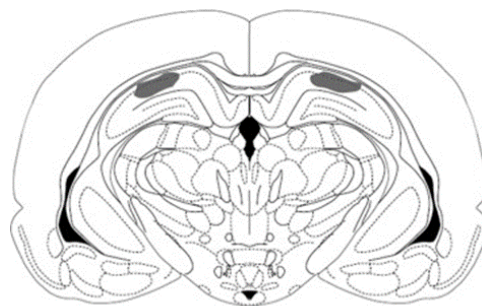
Para o tratamento farmacológico foi utilizado uma micro-seringa Hamilton acoplada a um tubo de polietileno contendo, em sua extremidade, uma agulha de infusão de 0,05 mm de diâmetro. Os animais foram infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal (1 μ l/lado) com veículo (Veh; solução salina 0,9%) ou droga. Ao término das micro infusões as agulhas eram mantidas no interior das cânulas guia por 60 segundos, a fim de evitar refluxo de líquido.

As drogas e as doses utilizadas neste estudo foram: o inibidor de síntese de proteínas Anisomicina (Tocris), ANI, 80 ug/uL (DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2013b; FURINI et al., 2015); o antagonista do receptor 5-HT_{5A}, SB-699551 (Tocris), 10 ug/uL (XU et al., 2013, p. 200); o antagonista do receptor 5-HT₆, SB-271046 (Sigma-Aldrich), 10 ug/uL (LOISEAU; DEKEYNE; MILLAN, 2008); o agonista do receptor 5-HT₆, WAY-208466 (Sigma-Aldrich), 0,04 ug/uL (LOISEAU; DEKEYNE; MILLAN, 2008); o antagonista do receptor 5-HT₇, SB-269970 (Tocris), 5 ug/uL (LIY-SALMERON; MENESES, 2007) e; o agonista do receptor 5-HT₇, AS-19 (Tocris), 5 ug/uL (ERIKSSON et al., 2012). Anisomicina foi dissolvida em uma solução de água destilada e ácido clorídrico (HCl) na concentração de 1 molar. O pH da solução de ANI foi ajustado com algumas gotas de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) na concentração de 1 molar. As demais substâncias foram dissolvidas em solução salina 0,9%. As soluções utilizadas como Veh foram as mesmas nas quais as substâncias acima foram dissolvidas.

2.6 Avaliação histológica da região estudada

Após o término dos experimentos comportamentais, os animais foram avaliados histologicamente quanto à colocação de suas cânulas e quanto à região cerebral atingida pela infusão. Para isso, após os procedimentos comportamentais os animais foram infundidos bilateralmente intra-CA1 com uma solução de azul de metileno 4% e, 15 min depois, foram submetidos à eutanásia. Seus cérebros foram removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias, quando então se procedeu a análise histológica. Somente os animais com a localização das cânulas dentro de 2 mm² dos locais desejados foram incluídos na análise estatística (Figura 3).

Figura 3: Desenho esquemático da área atingida pelas infusões farmacológicas



Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando o local de implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. (Fonte: Adaptado de Fiorenza *et al.*, 2012).

2.7 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software Prism Graph-Pad 5.1. Através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls, os dados obtidos na tarefa de medo condicionado ao contexto foram analisados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

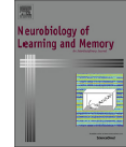
3 ARTIGO CIENTÍFICO

Neurobiology of Learning and Memory 142 (2017) 48–54



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynlme

Modulation of the consolidation and reconsolidation of fear memory by three different serotonin receptors in hippocampus

S.D. Schmidt^a, C.R.G. Furini^{a,b}, C.G. Zinn^a, L.E. Cavalcante^a, F.F. Ferreira^a, J.A.K. Behling^a, J.C. Myskiw^{a,b,*}, I. Izquierdo^{a,b,*}^a Memory Center, Brain Institute, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6690 - 2nd floor, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil^b National Institute of Translational Neuroscience (INNT), National Research Council of Brazil, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2016

Revised 22 December 2016

Accepted 24 December 2016

Available online 27 December 2016

Keywords:

Consolidation

Reconsolidation

Serotonergic receptors

Contextual fear conditioning

ABSTRACT

The process of memory formation is complex and highly dynamic. During learning, the newly acquired information is found in a fragile and labile state. Through a process known as consolidation, which requires specific mechanisms such as protein synthesis, the memory trace is stored and stabilized. It is known that when a consolidated memory is recalled, it again becomes labile and sensitive to disruption. To be maintained, this memory must undergo an additional process of restabilization called reconsolidation, which requires another phase of protein synthesis. Memory consolidation has been studied for more than a century, while the molecular mechanisms underlying the memory reconsolidation are starting to be elucidated. For this, is essential compare the participation of important neurotransmitters and its receptors in both processes in brain regions that play a central role in the fear response learning. With focus on serotonin (5-HT), a well characterized neurotransmitter that has been strongly implicated in learning and memory, we investigated, in the CA1 region of the dorsal hippocampus, whether the latest discovered serotonergic receptors, 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇, are involved in the consolidation and reconsolidation of contextual fear conditioning (CFC) memory. For this, male rats with cannulae implanted in the CA1 region received immediately after the training or reactivation session, or 3 h post-reactivation of the CFC, infusions of agonists or antagonists of the 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors. After 24 h, animals were subjected to a 3-min retention test. The results indicated that in the CA1 region of the hippocampus the 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ serotonin receptors participate in the reconsolidation of the CFC memory 3 h post-reactivation. Additionally, the results suggest that the 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors also participate in the consolidation of the CFC memory.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Recently acquired memories are labile; through posttraining consolidation (McGaugh, 2000), a process that requires protein synthesis and takes place mostly but not exclusively in the hippocampus (Izquierdo, Furini, & Myskiw, 2016; Izquierdo & Medina, 1997), memory traces are stored and stabilized in the course of 2–6 h. While this happens, cognition relies on parallel short-term memory systems (Izquierdo et al., 1998). A variety of processes in several brain regions over the next many hours or days sustain the trace from then on, which are called systems

consolidation (Izquierdo et al., 2016) and may include what some call memory persistence (Bekinschtein et al., 2008).

In the first few hours or days after posttraining consolidation is over, when the conditioned stimuli (CS) is reiterated, memories may be recalled and become again susceptible to disruption and/or to change (Balderas, Moreno-Castilla, & Bermudez-Rattoni, 2013; de Carvalho Myskiw, Furini, Schmidt, Ferreira, & Izquierdo, 2015; Rodriguez-Ortiz, Balderas, Garcia-DeLaTorre, & Bermudez-Rattoni, 2012; Santoyo-Zedillo, Rodriguez-Ortiz, Chavez-Marchetta, Bermudez-Rattoni, & Balderas, 2014). In order to be maintained the recalled memory requires another process of restabilization called reconsolidation, which also requires a peak of protein synthesis in the hippocampus and basolateral amygdala (Alberini, 2011; Alberini, Milekic, & Tronel, 2006; Bucherelli, Baldi, Mariottini, Passani, & Blandina, 2006). It may or may not be related to systems consolidation (Einarsson, Pors, & Nader, 2015; Izquierdo et al., 2016). Like extinction (de Carvalho Myskiw et al., 2015),

* Corresponding authors at: Av. Ipiranga, 6690 - IPB - 2nd floor, HSL - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: jociane_carvalho@hotmail.com (J.C. Myskiw), izquier@terra.com (I. Izquierdo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.017>

1074-7427/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

reconsolidation depends on the sheer unreinforced reiteration of the CS (Balderas et al., 2013; Rodríguez-Ortiz et al., 2012; Santoyo-Zedillo et al., 2014), not as was originally believed (Nader, 2015; Nader, Schafe, & Le Doux, 2000), on retrieval (Izquierdo et al., 2016).

The earlier studies on reconsolidation proposed that it simply recapitulates consolidation (Nader et al., 2000; Sara, 2000). This has been suggested to indeed be the case in a simple *Aplysia* model (Lee et al., 2012), but in higher animals it was repeatedly shown that both processes require different arrays of brain structures and substrates (Alberini, 2005; Bucherelli et al., 2006; Tronson & Taylor, 2007). So far, reconsolidation has been most studied in fear memories (Izquierdo et al., 2016), where it may have clinical relevance for the treatment of many mental disorders that involved dysfunctional memories (Baldi & Bucherelli, 2015; Schwabe, Nader, & Pruessner, 2014).

Participation of the main modulatory neurotransmitters of the brain [norepinephrine (NA), dopamine (DA), histamine (HIS), acetylcholine (ACh) and, to an extent, serotonin (5-HT)] in most aspects of memory is well documented (Izquierdo et al., 2016), except for reconsolidation, where the data are scanty and scattered. There is a consensus that reconsolidation depends on β -noradrenergic receptors (Bos, Beckers, & Kindt, 2014; Daniel, Kioko, & Federico, 2016; Villain et al., 2016; Zaichenko, Markevich, & Grigoryan, 2016) probably in the hippocampus and amygdala; one recent experiment suggests a parallel reliance on $\alpha 2$ receptors (Gazarini, Stern, Piornedo, Takahashi, & Bertoglio, 2014). Intra-hippocampal infusion of the $\alpha 7$ -nicotinic receptor agonist choline enhances reconsolidation (Blake, Boccia, Krawczyk, & Baratti, 2013), whereas that of the antagonist methyllycaconitine inhibits it (Blake, Krawczyk, Baratti, & Boccia, 2014). Dependence on hippocampal dopamine D1 and D2 receptors (Daniel et al., 2016; Merlo et al., 2015) has also been suggested. There have also been suggestions that reconsolidation might depend on serotonin 5-HT_{1A} receptors (Ogren et al., 2008).

Here we focus on whether the more recently described serotonergic receptors, 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇, are involved in the consolidation and reconsolidation of contextual fear conditioning memory, in the CA1 region of the dorsal hippocampus.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male *Wistar* rats (CrlCembe:WI; 3 months old, 300–330 g) purchased from Centro de Modelos Biológicos Experimentais of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (our regular provider) were used. Animals were housed four to a cage and kept with free access to food and water, under a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). The temperature of the animals' room was maintained at 22–24 °C. All procedures were approved by the Animal Committee on Ethics in the Care and Use of Laboratory Animals of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, in compliance with National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals.

2.2. Surgery

Animals were anesthetized with intraperitoneal injections of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and a 22-gauge guide cannulae were bilaterally implanted, 1 mm above of the dorsal CA1 area of the hippocampus (anterior, –4.2 mm; lateral, ± 3.0 mm; ventral, –1.8 mm) (Paxinos & Watson, 1986). Cannulae were fixed to the skull with dental cement. Animals were allowed 7 days to recover from surgery prior to behavioral procedures.

Animals were handled once daily for 3 consecutive days and all behavioral procedures were conducted between 8:00 and 11:00 a.m.

2.3. Contextual fear conditioning apparatus

Contextual fear conditioning (CFC) was performed in a conditioning chamber with aluminium walls (35 × 35 × 35 cm) and a clear front lid (Panlab®, Barcelona, Spain). The floor of the chamber was made of parallel stainless-steel grid bars and connected to a shock source for the delivery of foot shock. The conditioning chamber was placed inside a sound-attenuating box with a ventilating fan. The chamber was cleaned with 70% ethanol before and after each use. The percentage of the time that the animals spent freezing in the apparatus was measured automatically by a counter connected to photocells. Freezing behavior (no visible movement except for respiration) was used as an index of fear learning (de Carvalho Myskiw, Benetti, & Izquierdo, 2013; Fiorenza, Rosa, Izquierdo, & Myskiw, 2012).

2.4. Behavioral procedures

2.4.1. Consolidation of contextual fear conditioning

On the training day, animals were placed in the conditioning chamber and after 2 min three electrical foot shocks (0.5 mA, 2 s) were delivered at a 30 s interval. Animals were removed from the conditioning chamber 30 s after the last foot shock and placed back in their home cages. After 24 h, animals were placed in the same apparatus for a 3-min retention test, with no foot shocks (Fiorenza et al., 2012).

2.4.2. Reconsolidation of contextual fear conditioning

The training session of contextual fear conditioning was performed as described above, and after 24 h animals were placed in the same conditioning chamber for a 3-min reactivation session of CFC, in the absence of the foot shocks. After 24 h, animals were placed again in the same apparatus for a 3-min retention test, again with no foot shocks.

2.5. Pharmacological treatments

Microinjections into the CA1 region of the hippocampus were carried out less than 1 min after the contextual fear conditioning training or either 1 min or 3 h after the contextual fear conditioning reactivation session. Animals were gently restrained by hand and the injection needle (30 gauge) was fitted tightly into the guide, extending 1 mm from the tip of the guide cannula. The injection needle was connected to a 10 μ l Hamilton microsyringe and the infusions were performed at a rate of 1.0 μ l/60 s. The microinjection volume used was 1.0 μ l per side into the CA1 region of the dorsal hippocampus. At the end of the microinjection, the injection needle was left in place for an additional 60 s to minimize backflow, then carefully withdrawn and placed on the other side, and the procedure repeated.

The drugs and the doses used were the protein synthesis inhibitor anisomycin, 80 μ g/side (de Carvalho Myskiw et al., 2013; Furini et al., 2015); the 5-HT_{5A} receptor antagonist, SB-699551, 10 μ g/side (Xu, Zhao, Huo, Du, & Tang, 2013); the 5-HT₆ receptor antagonist, SB-271046, 10 μ g/side (Loiseau, Dekeyne, & Millan, 2008); the 5-HT₆ receptor agonist, WAY-208466, 0.04 μ g/side (Loiseau et al., 2008); the 5-HT₇ receptor antagonist, SB-269970, 5 μ g/side (Liy-Salmeron & Meneses, 2007) and; the 5-HT₇ receptor agonist, AS-19, 5 μ g/side (Eriksson et al., 2012), all purchased from Sigma-Aldrich or Tocris. All drugs were freshly dissolved in dimethyl sulfoxide 10% or in sterile saline 0.9% (Veh).

2.6. Cannulae placements

Correct cannulae placements were verified as follows. Two to four days after the end of the last behavioral procedure, animals were infused with a 4% methylene blue solution over 30 s into the CA1 region of the dorsal hippocampus (1.0 μ l/side) at the coordinates mentioned above. Thirty min later, animals were sacrificed by excess anesthesia and the brains were removed and kept in 10% formalin. The extension of the spread of the dye was considered to represent an estimate of the amount of the drug infused. Cannula placement was considered correct when the spread was \leq 1 mm from the intended infusion site; this occurred in 98% of the animals (de Carvalho Myskiw et al., 2013).

2.7. Statistical analysis

Data are presented as means \pm standard errors, and were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls Test using Graphpad Prism[®] software. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

Initially, with the purpose of verify the existence of reconsolidation process in our protocol, animals were trained in CFC, and 24 h later subjected to a 3-min reactivation session. Immediately or 3 h post-reactivation animals received bilateral intra-CA1 infusions of the Veh or protein synthesis inhibitor, anisomycin (80 μ g/side). The anisomycin-treated animals showed, immediately (Fig. 1A) or 3 h (Fig. 1B) post-reactivation, an impairment of CFC memory, a pattern previously reported, that indicates the existence of reconsolidation (Debiec, LeDoux, & Nader, 2002; Nader et al., 2000).

Once the protocol to study reconsolidation was established, in order to evaluate the participation of the serotonergic receptors in the consolidation and reconsolidation of CFC memory, animals received after CFC training or after reactivation session, bilateral intra-CA1 infusions of the Veh, antagonists or agonists of the 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors. Twenty-four hours later, animals were subjected to a 3-min retention test (de Carvalho Myskiw et al., 2013; Fiorenza et al., 2012).

3.1. Participation of the 5-HT_{5A} receptors in the consolidation and reconsolidation of the contextual fear conditioning memory

As shown in Fig. 2, animals that received the antagonist of the 5-HT_{5A} receptors, SB-699551 (10 μ g/side), into the CA1 region of the hippocampus immediately after the CFC training, exhibited similar levels of freezing than the Veh group during the retention test. Likewise, animals that received infusions of veh or SB-699551 (10 μ g/side) into the CA1 region of the hippocampus immediately after reactivation (Fig. 3A) exhibited similar levels of freezing during the reactivation session and retention test. In contrast, those that received SB-699551 (10 μ g/side) intra-CA1 3 h after the reactivation exhibited lower levels of freezing during the retention test when compared with the Veh group (Fig. 3B).

These results indicate that the antagonist of the 5-HT_{5A} receptors does not modulate the consolidation of CFC memory in the CA1 region of the dorsal hippocampus, but does modulate the reconsolidation of the CFC memory 3 h post-reactivation, impairing the original memory.

3.2. Participation of the 5-HT₆ receptors in the consolidation and reconsolidation of the contextual fear conditioning memory

As demonstrated in Fig. 4, animals that received the agonist of the 5-HT₆ receptors, WAY-208466 (0.04 μ g/side), intra-CA1 immediately after the CFC training exhibited similar levels of freezing as the Veh group during the retention test. In turn, animals that

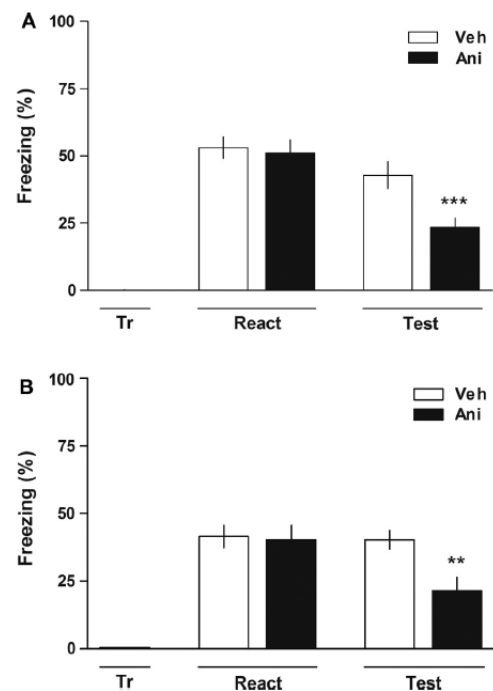


Fig. 1. Effect of the protein synthesis inhibitor, anisomycin, in the CA1 region of the hippocampus on the reconsolidation of contextual fear conditioning. Immediately (A) or 3 h (B) post-reactivation of contextual fear conditioning, animals received bilateral intra-CA1 infusions of Veh or anisomycin (Ani; 80 μ g/side) and 24 h later they were subjected to a 3-min retention test. Data are presented as mean \pm SEM of the percentage of time spent freezing. **p < 0.01 and ***p < 0.001 for Veh vs. Ani on the retention test. Newman-Keuls test after one-way ANOVA; n = 11–12 animals per group.

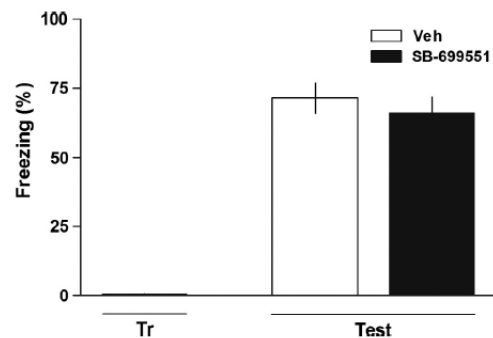


Fig. 2. Participation of the 5-HT_{5A} receptors in the CA1 region of the hippocampus on the consolidation of contextual fear conditioning. Immediately after the contextual fear conditioning, animals received bilateral intra-CA1 infusions of Veh or SB-699551 (10 μ g/side) and 24 h later they were subjected to a 3-min retention test. Data are presented as mean \pm SEM of the percentage of time spent freezing. Newman-Keuls test after one-way ANOVA; n = 11–12 animals per group.

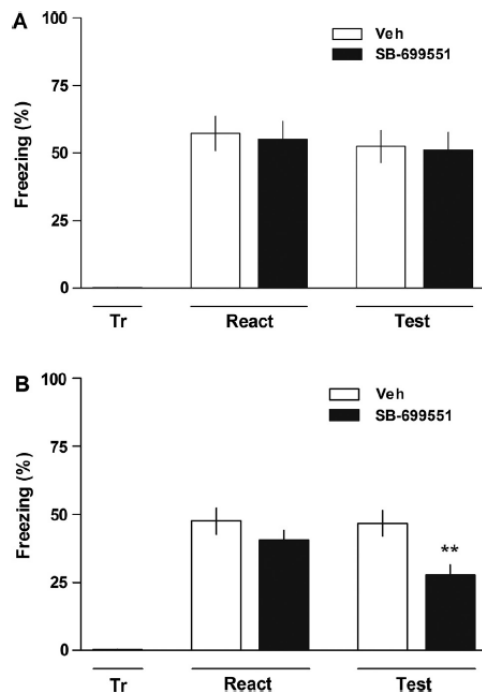


Fig. 3. Participation of the 5-HT_{5A} receptors in the CA1 region of the hippocampus on the reconsolidation of contextual fear conditioning. Immediately (A) or 3 h (B) post-reactivation of the contextual fear conditioning, animals received bilateral intra-CA1 infusions of Veh or SB-699551 (10 µg/side) and 24 h later they were subjected to a 3-min retention test. Data are presented as mean ± SEM of the percentage of time spent freezing. ***p* < 0.01 for SB-699551 vs. Veh group on the retention test. Newman-Keuls test after one-way ANOVA; *n* = 11–12 animals per group.

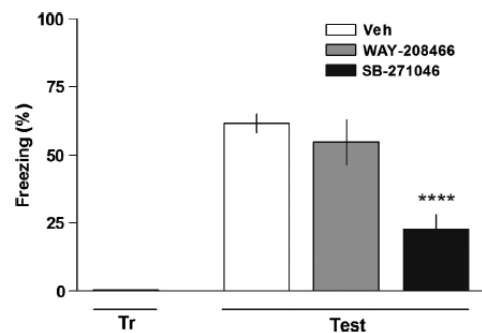


Fig. 4. Participation of the 5-HT₆ receptors in the CA1 region of the hippocampus on the consolidation of contextual fear conditioning. Immediately after the contextual fear conditioning, animals received bilateral intra-CA1 infusions of Veh, WAY-208466 (0.04 µg/side) or SB-271046 (10 µg/side) and 24 h later they were subjected to a 3-min retention test. Data are presented as mean ± SEM of the percentage of time spent freezing. *****p* < 0.0001 for SB-271046 vs. Veh group. Newman-Keuls test after one-way ANOVA; *n* = 11–12 animals per group.

received the antagonist of the 5-HT₆ receptors, SB-271046 (10 µg/side), into the CA1 region of the hippocampus, after the CFC training exhibited lower levels of freezing during the retention test when compared with the animals that received Veh. These results suggest that the antagonist of the 5-HT₆ receptors, SB-271046, impairs the consolidation of CFC memory in the CA1 region of the dorsal hippocampus.

Animals that received WAY-208466 (0.04 µg/side) or SB-271046 (10 µg/side) into the CA1 region of the hippocampus, immediately post-reactivation (Fig. 5A), exhibited similar levels of freezing in both reactivation session and retention test. On the other hand, animals that received WAY-208466 (0.04 µg/side) 3 h post-reactivation (Fig. 5B) showed lower levels of freezing during the retention test when compared with the animals that received Veh.

These results suggest that the antagonist of the 5-HT₆ receptors modulates the consolidation of CFC memory in the CA1 region and the agonist modulates the reconsolidation of CFC memory in the CA1 region 3 h post-reactivation, impairing the original memory.

3.3. Participation of the 5-HT₇ receptors in the consolidation and reconsolidation of the contextual fear conditioning memory

As shown in Fig. 6, animals that received the agonist of the 5-HT₇ receptors, AS-19 (5 µg/side), intra-CA1 immediately after the CFC training exhibited similar levels of freezing than the Veh group during the retention test. Interestingly, animals that received the antagonist of the 5-HT₇ receptors, SB-269970 (5 µg/side), into the CA1 region after the CFC training exhibited higher levels of freezing during the retention test when compared with the animals that received Veh. Similarly, animals that received SB-269970

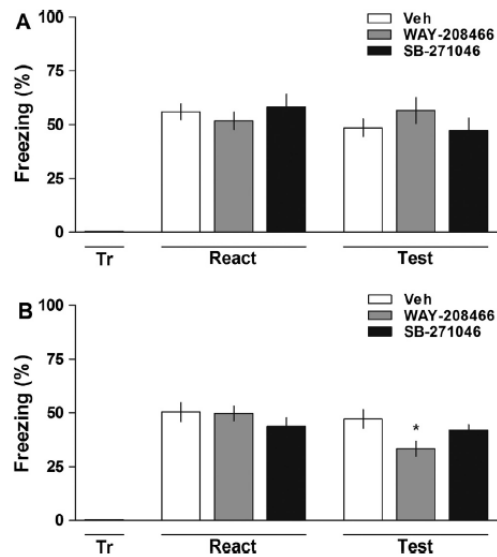


Fig. 5. Participation of the 5-HT₆ receptors in the CA1 region of the hippocampus on the reconsolidation of contextual fear conditioning. Immediately (A) or 3 h (B) post-reactivation of the contextual fear conditioning, animals received bilateral intra-CA1 infusions of Veh, WAY-208466 (0.04 µg/side) or SB-271046 (10 µg/side) and 24 h later they were subjected to a 3-min retention test. Data are presented as mean ± SEM of the percentage of time spent freezing. **p* < 0.05 for WAY-208466 vs. Veh group. Newman-Keuls test after one-way ANOVA; *n* = 11–12 animals per group.

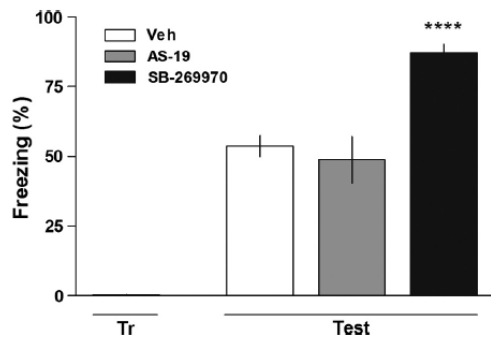


Fig. 6. Participation of the 5-HT₇ receptors in the CA1 region of the hippocampus on the consolidation of contextual fear conditioning. Immediately after the contextual fear conditioning, animals received bilateral intra-CA1 infusions of Veh, AS-19 (5 µg/side) or SB-269970 (5 µg/side) and 24 h later they were subjected to a 3-min retention test. Data are presented as mean ± SEM of the percentage of time spent freezing. *****p* < 0.0001 for SB-269970 vs. Veh group on the retention test. Newman-Keuls test after one-way ANOVA; *n* = 11–12 animals per group.

(5 µg/side) into the CA1 region of the hippocampus 3 h post-reactivation (Fig. 7B), but not immediately after it (Fig. 7A), exhibited higher levels of freezing during the retention test when compared with the Veh group.

Together, these results indicate that the antagonist of the 5-HT₇ receptors, SB-269970, facilitates both consolidation and reconsolidation of CFC memory, which is the opposite of what 5-HT_{5A} and 5-HT₆ receptors do (Figs. 3 and 5).

4. Discussion

The memory stabilization processes are essential for the formation and maintenance of memories. Despite of some similarities between consolidation and reconsolidation, the time course of the two processes is different and the brain structures and molecular mechanisms involved may be not necessarily coincident (Alberini, 2005; Bucherelli et al., 2006; Tronson & Taylor, 2007).

With focus on the more recently described serotonergic receptors, we investigated whether the 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors of the CA1 region of the hippocampus are involved in the consolidation and reconsolidation of contextual fear conditioning (CFC) memory. The present findings show that hippocampal the 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ serotonin receptors modulate the reconsolidation of CFC memory, and in addition 5-HT₆ and 5-HT₇ also modulate the consolidation of this memory.

Here we demonstrated that 5-HT_{5A} receptors seem not to be involved with the consolidation of CFC. On the other hand, we found that this receptor participates in the reconsolidation process impairing the original memory. While in associative learning task, the systemic administration of 5-HT_{5A} antagonists decreased conditioned responses during short-term and long-term-memory (Gonzalez, Chávez-Pascacio, & Meneses, 2013), here we verified an effect only on the reconsolidation process. These differences on the effect can be explained by the different doses and routes of administration.

Considering that there are no selective 5-HT_{5A} receptors agonists, further studies with selective 5-HT_{5A} compounds and using other behavioral tasks are necessary.

There is general agreement that 5-HT₆ receptor antagonists produce promnesic and/or anti-amnesic effects on different memories (Meneses, 2001; Quiédeville et al., 2014; Ramírez, 2013; Woods, Clarke, Layfield, & Fone, 2012; Woolley, Bentley, Sleight,

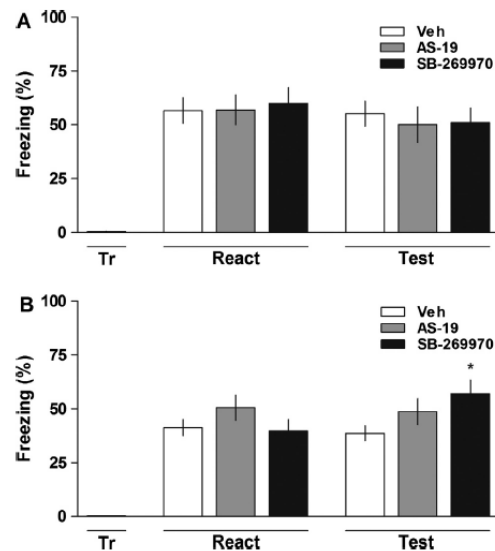


Fig. 7. Participation of the 5-HT₇ receptors in the CA1 region of the hippocampus on the reconsolidation of contextual fear conditioning. Immediately (A) or 3 h (B) post-reactivation of the CFC, the animals received bilateral intra-CA1 infusions of Veh, AS-19 (5 µg/side) or SB-269970 (5 µg/side) and 24 h later they were subjected to a 3-min retention test. Data are presented as mean ± SEM of the percentage of time spent freezing. **p* < 0.05 for SB-269970 vs. Veh group on the retention test. Newman-Keuls test after one-way ANOVA; *n* = 11–12 animals per group.

Marsden, & Fone, 2001; Woolley, Marsden, Sleight, & Fone, 2003). However, some discrepant results have been reported (Gravius et al., 2011; Lindner et al., 2003; Russell & Dias, 2002). This differences can be probably related to the use of different antagonists, experimental conditions and instruments for measuring behavior (Meneses, 2013). Here we show that the blockade of 5-HT₆ receptors impair the consolidation of CFC memory while the activation of this receptor modulates and participates of the reconsolidation process impairing the original memory.

Studies described that the activation of 5-HT₆ receptors can reduce the long-term potentiation, a physiological model for studying memory, and this effect can be blocked by a selective antagonist of these receptors. Also, the activation of the 5-HT₆ receptors can increase the release of GABA into the CA1 region of the hippocampus (West, Marcy, Marino, & Schaffhauser, 2009), what could explain the results observed on the reconsolidation of CFC memory.

The findings on that came as a surprise were those on 5-HT₇ receptor which modulates both consolidation and reconsolidation positively, i.e. in an opposite way to that shown here for 5-HT_{5A} and 5-HT₆.

There are several possible explanations for this. One is that 5-HT₇ receptors may interact functionally with other 5-HT receptors, and change the valence of their behavioral actions. Stiedl, Pappa, Konradsson-Geuken, & Ögren, 2015 described interactions between 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptors, including 5-HT_{1A} autoreceptors, which may alter the function of both. Meneses & Gasbarri, 2016 comment on the proposal by Guseva, Wirth, and Ponimaskin (2014) that indeed 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptors may form heterodimers, which leads to a wide spectrum of possibilities. Of course, two related possibilities that might deserve examination are: (i) that the serotonin-releasing fibers that end upon

hippocampal neurons containing 5-HT₇ receptors are separate from those that release serotonin upon the other receptors; (ii) that the hippocampal cells with 5-HT₇ receptors are different from those that contain the other 5-HT receptors. This would require a histochemical re-study of the distribution of serotonergic neurons within the raphe nucleus and of their endings in the hippocampus and perhaps other brain regions as well. Similar dichotomies have been recently proposed for the role of histaminergic synapses on hippocampal neurons in the regulation of retrieval in the hippocampus, where H1 receptors have stimulant effects opposite to H2 effects which are inhibitory (Izquierdo et al., 2016).

Thus, a new role for the serotonergic 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors on memory process has been described here, representing a new perspective with regard to their functions in process related to memory mechanisms as well as their therapeutic applications, providing new evidences in memory research that encourage new lines of investigation.

Acknowledgments

Work supported by grants and fellowships from the National Research Council of Brazil (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Brazil.

References

- Alberini, C. M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: Are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in Neurosciences*, 28, 51–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2004.11.001>.
- Alberini, C. M. (2011). The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00012>.
- Alberini, C. M., Milekic, M. H., & Tronel, S. (2006). Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 63 (9), 999–1008. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-006-6025-7>.
- Balderas, I., Moreno-Castilla, P., & Bermudez-Rattoni, F. (2013). Dopamine D1 receptor activity modulates object recognition memory consolidation in the perirhinal cortex but not in the hippocampus. *Hippocampus*. <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.22143>.
- Baldi, E., & Bucherelli, C. (2015). Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 53, 160–190. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.04.003>.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katzev, C., Slipczuk, L., Rossato, J. I., Goldin, A., ... Medina, J. H. (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2711–2716. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0711863105>.
- Blake, M. G., Boccia, M. M., Krawczyk, M. C., & Baratti, C. M. (2013). Hippocampal $\alpha 7$ -nicotinic cholinergic receptors modulate memory reconsolidation: A potential strategy for recovery from amnesia. *Neurobiology of Learning and Memory*, 106, 193–203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2013.09.001>.
- Blake, M. G., Krawczyk, M. C., Baratti, C. M., & Boccia, M. M. (2014). Neuropharmacology of memory consolidation and reconsolidation: Insights on central cholinergic mechanisms. *Journal of Physiology, Paris*, 108(4–6), 286–291. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.04.005>.
- Bos, M. G. N., Beckers, T., & Kindt, M. (2014). Noradrenergic blockade of memory reconsolidation: A failure to reduce conditioned fear responding. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 412. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00412>.
- Bucherelli, C., Baldi, E., Mariottini, C., Passani, M. B., & Blandina, P. (2006). Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 13(4), 426–430. <https://doi.org/10.1101/lm.326906>.
- Daniel, O.-G., Kioko, G.-R., & Federico, B.-R. (2016). Differential involvement of glutamatergic and catecholaminergic activity within the amygdala during taste aversion retrieval on memory expression and updating. *Behavioural Brain Research*, 307, 120–125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.038>.
- de Carvalho Myskiw, J., Benetti, F., & Izquierdo, I. (2013). Behavioral tagging of extinction learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(3), 1071–1076. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1220875110>.
- de Carvalho Myskiw, J., Furini, C. R. G., Schmidt, B., Ferreira, F., & Izquierdo, I. (2015). Extinction learning, which consists of the inhibition of retrieval, can be learned without retrieval. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2), E230–E233. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1423465112>.
- Debiec, J., LeDoux, J. E., & Nader, K. (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron*, 36(3), 527–538.
- Einarsson, E. Ö., Pors, J., & Nader, K. (2015). Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 40(2), 480–487. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2014.197>.
- Eriksson, T. M., Holst, S., Stan, T. L., Hager, T., Sjögren, B., Ögren, S. Ö., ... Stiedl, O. (2012). 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptor crosstalk in the regulation of emotional memory: Implications for effects of selective serotonin reuptake inhibitors. *Neuropharmacology*, 63(6), 1150–1160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.061>.
- Florensa, N. G., Rosa, J., Izquierdo, I., & Myskiw, J. C. (2012). Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. *Behavioural Brain Research*, 232(1), 210–216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.015>.
- Furini, C. R. G., Myskiw, J. de C., Schmidt, B. E., Zinn, C. G., Peixoto, P. B., Pereira, L. D., & Izquierdo, I. (2015). The relationship between protein synthesis and protein degradation in object recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 294, 17–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.07.038>.
- Gazarini, L., Stern, C. A. J., Piorno, R. R., Takahashi, R. N., & Bertoglio, L. J. (2014). PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(1). <http://dx.doi.org/10.1093/ijnp/pty026>.
- Gonzalez, R., Chávez-Pascacio, K., & Meneses, A. (2013). Role of 5-HT_{5A} receptors in the consolidation of memory. *Behavioural Brain Research*, 252, 246–251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.051>.
- Gravius, A., Laszy, J., Pietraszek, M., Sığıh, K., Nagel, J., Chambon, C., ... Gyertyán, I. (2011). Effects of 5-HT₆ antagonists, Ro-4368554 and SB-258585, in tests used for the detection of cognitive enhancement and antipsychotic-like activity. *Behavioural Pharmacology*, 22(2), 122–135. <http://dx.doi.org/10.1097/FBP.0b013e328343d804>.
- Guseva, D., Wirth, A., & Ponomareva, E. (2014). Cellular mechanisms of the 5-HT₇ receptor-mediated signaling. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 306. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00306>.
- Izquierdo, I., Barros, D. M., Mello e Souza, T., de Souza, M. M., Izquierdo, L. A., & Medina, J. H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393(6886), 635–636. <http://dx.doi.org/10.1038/31371>.
- Izquierdo, I., Furini, C. R. G., & Myskiw, J. C. (2016). Fear memory. *Physiological Reviews*, 96(2), 695–750. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>.
- Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1997). Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68, 285–316. <http://dx.doi.org/10.1006/nlme.1997.3799>.
- Lee, S.-H., Shim, J., Choi, S.-L., Lee, N., Lee, C.-H., Bailey, C. H., ... Kaang, B.-K. (2012). Learning-related synaptic growth mediated by internalization of Aplysia cell adhesion molecule is controlled by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthetic pathway. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(46), 16296–16305. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1872-12.2012>.
- Lindner, M. D., Hodges, D. B., Hogan, J. B., Orie, A. F., Corsa, J. A., Barten, D. M., ... Gribkoff, V. K. (2003). An assessment of the effects of serotonin 6 (5-HT₆) receptor antagonists in rodent models of learning. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(2), 682–691. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.103.056002>.
- Liy-Salmeron, G., & Meneses, A. (2007). Role of 5-HT₁₋₇ receptors in short- and long-term memory for an autoshaping task: Intrahippocampal manipulations. *Brain Research*, 1147, 140–147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.007>.
- Loiseau, F., Dekeyne, A., & Millan, M. J. (2008). Pro-cognitive effects of 5-HT₆ receptor antagonists in the social recognition procedure in rats: Implication of the frontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)*, 196(1), 93–104. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-007-0934-5>.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory – A century of consolidation. *Science*, 287, 248–251.
- Meneses, A. (2001). Role of 5-HT₆ receptors in memory formation. *Drug News & Perspectives*, 14(7), 396–400.
- Meneses, A. (2013). 5-HT systems: Emergent targets for memory formation and memory alterations. *Reviews in the Neurosciences*, 24(6), 629–664. <http://dx.doi.org/10.1515/revneuro-2013-0026>.
- Meneses, A., & Gasbarri, B. (2016). Editorial: Serotonin and memory. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 8. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2016.00008>.
- Merlo, E., Ratanó, P., Ilioi, E. C., Robbins, M. A. L. S., Everitt, B. J., & Milton, A. L. (2015). Amygdala dopamine receptors are required for the destabilization of a reconsolidating appetitive memory(1,2). *eNeuro*, 2(1). <http://dx.doi.org/10.1523/ENEURO.0024-14.2015>.
- Nader, K. (2015). Reconsolidation and the dynamic nature of memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(10), a021782. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a021782>.
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722–726. <http://dx.doi.org/10.1038/35021052>.
- Ogren, S. O., Eriksson, T. M., Elvander-Tottie, E., D'Addario, C., Ekström, J. C., Svenningsson, P., ... Stiedl, O. (2008). The role of 5-HT_{1A} receptors in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 195(1), 54–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.023>.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (2nd ed.). Sydney: Academic Press.

- Quiedeville, A., Boulouard, M., Da Silva Costa-Aze, V., Dauphin, F., Bouet, V., & Freret, T. (2014). 5-HT₆ receptor antagonists as treatment for age-related cognitive decline. *Reviews in the Neurosciences*, 25(3), 417–427. <http://dx.doi.org/10.1515/revneuro-2014-0013>.
- Ramírez, M. J. (2013). 5-HT₆ receptors and Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 5(2), 15. <http://dx.doi.org/10.1186/alzrt169>.
- Rodríguez-Ortiz, C. J., Balderas, I., García-DeLaTorre, P., & Bermudez-Rattoni, F. (2012). Taste aversion memory reconsolidation is independent of its retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 98(3), 215–219. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2012.08.002>.
- Russell, M. G. N., & Dias, R. (2002). Memories are made of this (perhaps): A review of serotonin 5-HT₆ receptor ligands and their biological functions. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(6), 643–654.
- Santoyo-Zedillo, M., Rodríguez-Ortiz, C. J., Chavez-Marchetta, G., Bermudez-Rattoni, F., & Balderas, I. (2014). Retrieval is not necessary to trigger reconsolidation of object recognition memory in the perirhinal cortex. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 21(9), 452–456. <https://doi.org/10.1101/lm.035428.114>.
- Sara, S. J. (2000). Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 7(2), 73–84.
- Schwabe, L., Nader, K., & Pruessner, J. C. (2014). Reconsolidation of human memory: Brain mechanisms and clinical relevance. *Biological Psychiatry*, 76(4), 274–280. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.03.008>.
- Stiedl, O., Pappa, E., Konradsson-Geuken, A., & Ögren, S. O. (2015). The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT_{1A} and 5-HT₇ and its interaction in emotional learning and memory. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 162. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2015.00162>.
- Tronson, N. C., & Taylor, J. R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(4), 262–275. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2090>.
- Villain, H., Benkahoul, A., Drougard, A., Lafragette, M., Muzotte, E., Pech, S., ... Rouillet, P. (2016). Effects of propranolol, a β -noradrenergic antagonist, on memory consolidation and reconsolidation in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10, 49. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00049>.
- West, P. J., Marcy, V. R., Marino, M. J., & Schaffhauser, H. (2009). Activation of the 5-HT₆ receptor attenuates long-term potentiation and facilitates GABAergic neurotransmission in rat hippocampus. *Neuroscience*, 164, 692–701.
- Woods, S., Clarke, N., Layfield, R., & Fone, K. (2012). 5-HT₆ receptor agonists and antagonists enhance learning and memory in a conditioned emotion response paradigm by modulation of cholinergic and glutamatergic mechanisms: 5-HT₆ receptor effects on associative learning. *British Journal of Pharmacology*, 167(2), 436–449. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02022.x>.
- Woolley, M. L., Bentley, J. C., Sleight, A. J., Marsden, C. A., & Fone, K. C. (2001). A role for 5-HT₆ receptors in retention of spatial learning in the Morris water maze. *Neuropharmacology*, 41(2), 210–219.
- Woolley, M. L., Marsden, C. A., Sleight, A. J., & Fone, K. C. F. (2003). Reversal of a cholinergic-induced deficit in a rodent model of recognition memory by the selective 5-HT₆ receptor antagonist, Ro 04-6790. *Psychopharmacology (Berl)*, 170(4), 358–367. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-003-1552-5>.
- Xu, W. J., Zhao, Y., Huo, F. Q., Du, J. Q., & Tang, J. S. (2013). Involvement of ventrolateral orbital cortex 5-HT₁₋₇ receptors in 5-HT induced depression of spared nerve injury allodynia. *Neuroscience*, 238, 252–257. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.036>.
- Zaichenko, M. I., Markevich, V. A., & Grigoryan, G. A. (2016). Propranolol impairs memory reconsolidation at single and multiple paired with tone painful electrocutaneous stimulations. *Zhurnal Vysshei Nervnoi Deiatel'nosti Imeni I P Pavlova*, 66(2), 220–228.

***CAPÍTULO III:
PARTICIPAÇÃO DAS ENZIMAS ANIDRASES CARBÔNICAS
NA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO DE MEDO AO CONTEXTO***

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Investigar o envolvimento das enzimas anidrases carbônicas na memória de extinção de medo condicionado ao contexto.

1.2 Objetivos específicos

Verificar a participação das anidrases carbônicas no processo de aquisição da memória de extinção de medo condicionado ao contexto.

Verificar a participação das anidrases carbônicas no processo de consolidação da memória de extinção de medo condicionado ao contexto.

Verificar a participação das anidrases carbônicas, de regiões cerebrais específicas, na consolidação da memória de extinção de medo condicionado ao contexto.

Verificar a expressão de c-Fos nas regiões cerebrais onde as anidrases carbônicas participam da consolidação da memória de extinção de medo condicionado ao contexto.

2 MÉTODOS

2.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos com cerca de três meses de idade, pesando em média 300 g. Os mesmos foram adquiridos da empresa europeia *Charles River Laboratories* e entregues no biotério da *Università degli Studi di Firenze*, Itália. Os animais foram mantidos em caixas plásticas especiais, forradas com maravalha e com capacidade para até 4 animais. Os mesmos foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas (luz a partir das 7:00 horas e escuro a partir das 19:00 horas), com água e comida a vontade e temperatura ambiente constante de 23°C. Todos os procedimentos foram realizados somente após a aprovação dos mesmos no Ministério da Saúde da Itália, sob o número de autorização 649/2017.

2.2 Cirurgia esterotáxica

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia de 0,2 mm de calibre, posicionadas 1,0 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal (CA1; A -4.2, L± 3.0, V -1.8 mm), córtex pré-frontal ventro medial (vmPFC; A +3.2, L± 0.8, V -2. mm), amígdala basolateral (BLA; A -2.4, L± 5.1, V -7.5 mm) ou substância nigra (SN; A -5.5, L± 2.2, V -8.0 mm), segundo O Atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS, 1986). Todo o procedimento de cirurgia estereotáxica foi realizado com os animais previamente anestesiados com ketamina e xilazina, ambos administrados intra-peritonealmente (i.p.) nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente. Os procedimentos comportamentais foram realizados após 7 dias da cirurgia estereotáxica, para completa recuperação dos animais experimentais.

2.3 Manipulação dos animais experimentais

Método descrito anteriormente. Ver item 2.3 do Capítulo II, pág 43.

2.4 Condicionamento Clássico

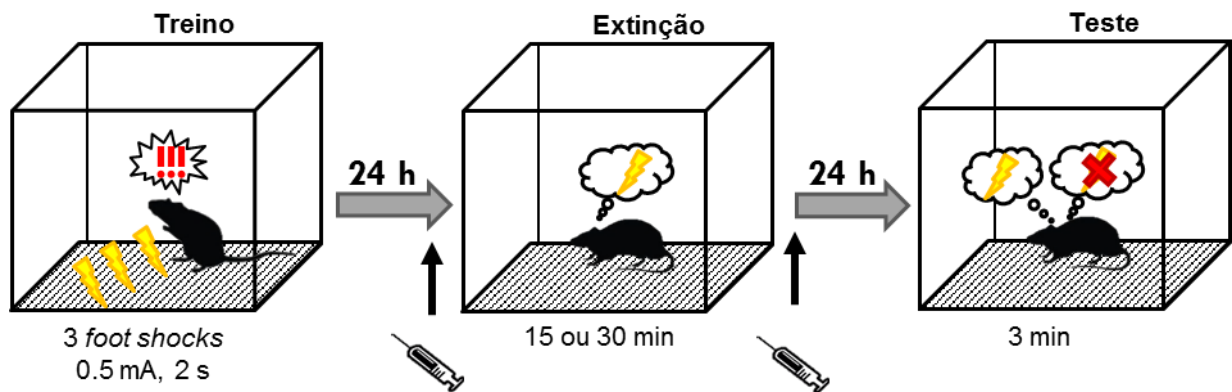
Método descrito anteriormente. Ver item 2.4 do Capítulo II, pág. 43.

2.4.1 Protocolo de extinção da memória de MCC

No dia 1 (sessão de treino), os animais foram colocados individualmente na caixa de condicionamento e, após um período de 120 s, receberam 3 estímulos elétricos (0.5 mA, 2 s) nas patas, em intervalos de 30 s cada. Trinta segundos após o último estímulo elétrico, os animais foram retirados do aparato e recolocados na caixa moradia. Vinte e quatro horas depois (dia 2), os animais foram novamente colocados na caixa de condicionamento para uma sessão de treinamento de extinção, na ausência do estímulo elétrico. A duração da mesma variou de acordo com os seguintes propósitos: na tentativa de prejudicar a consolidação da memória de extinção de MCC, a duração do treino de extinção foi de 30 min (tempo suficiente para a consolidação dessa memória); por sua vez, com o intuito de facilitar a consolidação da memória de extinção de MCC, a duração do treino de extinção foi de apenas 15 min (tempo insuficiente para a consolidação dessa memória). Imediatamente após ambos os treinos, os animais receberam diferentes tratamentos farmacológicos. Ainda, com a finalidade de modular a

aquisição da memória de extinção de MCC, os animais receberam diferentes tratamentos farmacológicos 10 min antes da sessão de extinção mais longa. No dia 3 (teste de retenção), os animais foram recolocados na caixa de condicionamento pelo período de 180 s (Figura 4), na ausência do estímulo elétrico. O tempo total de *freezing* do animal foi medido como resposta condicionada durante as sessões de treino da extinção e teste (FIORENZA et al., 2012).

Figura 4: Esquema ilustrativo do protocolo de extinção da memória de MCC



Fonte: O autor (2018)

2.5 Intervenções farmacológicas

Os tratamentos farmacológicos foram realizados através da administração intraperitoneal (i.p.) ou da infusão bilateral em regiões cerebrais específicas. Para esta última foi utilizada uma micro-seringa Hamilton acoplada a um tubo de polietileno contendo, em sua extremidade, uma agulha de infusão de 0,05 mm de diâmetro. Os animais foram infundidos bilateralmente nas regiões CA1 (1 μ l/lado), vmPFC (1 μ l/lado), BLA (0.5 μ l/lado) ou SN (1 μ l/lado) com veículo ou droga. Ao término das micro infusões as agulhas eram mantidas no interior das cânulas guia por 60 segundos, a fim de evitar refluxo de líquido.

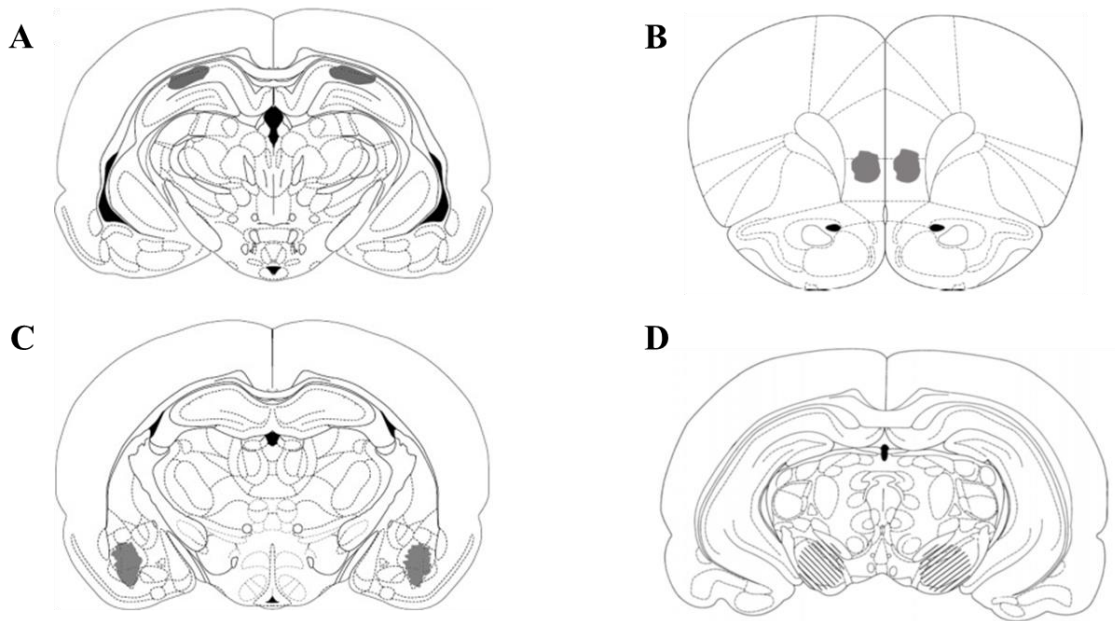
As drogas e as doses utilizadas neste estudo foram: o inibidor das anidrases carbônicas acetazolamida, ACTZ, 30 mg/kg i.p. (CANTO DE SOUZA et al., 2017) ou 10 nmol/uL intra região cerebral (SUN; ALKON, 2001); o inibidor das anidrases carbônicas C18 [1-N-(4-sulfamoylphenyl-ethyl)-2,4,6-trimethylpyridinium perchlorate] que, diferentemente da ACTZ, não ultrapassa a barreira hematoencefálica, 30 mg/kg i.p. (CANTO DE SOUZA et al., 2017); o ativador das anidrases carbônicas d-fenilalanina, D-Phe, 300 mg/Kg i.p. (CANTO DE SOUZA et al., 2017); e o inibidor de síntese de proteínas anisomicina, ANI, 80 μ g/uL intra região cerebral (DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2013b; FURINI et al.,

2015). Acetazolamida, d-fenilalanina e anisomicina foram adquiridas do laboratório Sigma-Aldrich, Milão, Itália, enquanto que o C18 foi sintetizado pelo laboratório do Prof. Claudiu T. Supuran na *Università degli Studi di Firenze* (SUPURAN, 2008). Acetazolamida foi dissolvida em solução salina 0,9% acrescida de algumas gotas de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) na concentração de 1 molar. O pH da solução de ACTZ foi ajustado com algumas gotas de uma solução de ácido clorídrico (HCl) também na concentração de 1 molar. C18 e d-fenilalanina foram dissolvidas em solução salina 0,9%. Anisomicina foi dissolvida conforme já explicado anteriormente (pág. 46). As soluções utilizadas como Veh foram as mesmas nas quais as substâncias acima foram dissolvidas.

2.6 Avaliação histológica da região estudada

Após o término dos experimentos comportamentais, os animais foram avaliados histologicamente quanto à colocação de suas cânulas e quanto à região cerebral atingida pela infusão. Para isso, após os procedimentos comportamentais os animais foram infundidos bilateralmente intra-CA1, -vmPFC, -BLA ou -SN, com uma solução de azul de metileno 4% e, 15 min depois, foram eutanasiados. Seus cérebros foram removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias, quando então se procedeu a análise histológica. Somente os animais com a localização das cânulas dentro de 2 mm² dos locais desejados foram incluídos na análise estatística (Figura 5).

Figura 5: Desenho esquemático da área atingida pelas infusões farmacológicas



Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando o local de implantação das cânulas de infusão nas regiões CA1 do hipocampo dorsal (A), córtex pré-frontal ventromedial (B), amígdala basolateral (C) e substância nigra (D). (Fonte: Adaptado de Fiorenza *et al.*, 2012; Baldi *et al.*, 2007).

2.7 Imuno-histoquímica para quantificação de c-Fos

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada com o intuito de avaliar a expressão da proteína c-Fos nas regiões cerebrais de interesse após a evocação da memória de extinção de MCC. Desta forma, animais foram submetidos a sessão de treino na tarefa de MCC e 24 h após foram submetidos a uma sessão de extinção de 30 min. Imediatamente após, os animais receberam a administração i.p. de Veh ou ACTZ (30 mg/kg) e depois de 24 h os mesmos foram submetidos ao teste de retenção da memória de extinção. Noventa min após o teste, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg, i.p.) e submetidos à perfusão transcardíaca com solução fisiológica fria seguida de paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato (PB) 0.1 M, pH 7.4. Para tal, um cateter metálico ligado a uma bomba de perfusão foi introduzido na artéria aorta para perfundir aproximadamente 200 mL de cada solução. A aorta descendente foi clampeada e um corte no átrio direito foi realizado para drenagem das soluções administradas. Após, os cérebros foram removidos da caixa craniana, pós-fixados em solução de PFA 4% *overnight* (4°C) e, posteriormente, crioprotetidos em uma solução de sacarose 30% até sua saturação (aproximadamente 72 horas). Depois deste período, os mesmos foram congelados em isopentano resfriado em gelo seco e mantidos a temperatura de -80°C. Com o

auxílio de um criostato, os cérebros congelados foram seccionados em fatias de 40 micrômetros e as secções correspondentes às estruturas cerebrais de interesse foram coletadas e armazenadas em uma solução anti-*freezing*.

A imuno-histoquímica para c-FOS foi realizada através do método *free-floating*, no qual os cortes das regiões cerebrais de interesse são individualmente colocados nos poços de uma placa de Elisa para que a penetração dos anticorpos no tecido seja mais uniforme. O protocolo utilizado para quantificar a expressão de c-Fos nas fatias das regiões CA1, vmPFC, BLA e SN foi realizado de acordo com a seguinte sequência: lavagens de 10 min, pré-incubação em solução de água oxigenada 0.75% durante 30 min, lavagens de 10 min, pré-incubação em solução de BSA 0.2% durante 30 min, incubação *overnight* a 4°C com anticorpo primário para c-Fos (1:5.000; Sigma-Aldrich), lavagens de 10 min, incubação com anticorpo secundário biotilado (1:1.000) durante 1 hr, lavagens de 10 min, incubação com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastin® ABC kit; Vector Laboratories) durante 1 hr, lavagens de 10 min, coloração com a solução de 3,3'-diaminobenzidina, *DAB Substrate* (Sigma-Aldrich). Ao final, as fatias foram montadas em lâminas previamente gelatinizadas e observadas em um microscópio Olympus BX40 equipado com uma câmera Nikon Ds-F1. Núcleos imunopositivos de c-FOS foram contados bilateralmente utilizando o software ImageJ (*National Institutes of Health*) em quatro a cinco secções por região por rato e normalizado para uma área de 1 mm² (FABBRI et al., 2016; PROVENSÍ et al., 2014).

2.8 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software Prism Graph-Pad 5.1. Os dados obtidos na tarefa de medo condicionado ao contexto foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os resultados da reação de imuno-histoquímica para c-FOS foram obtidos a partir dos valores médios de quatro a cinco secções por região para cada animal. Estes dados foram normalizados para uma área de 1 mm² e analisados através do teste *t* de *Student*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS

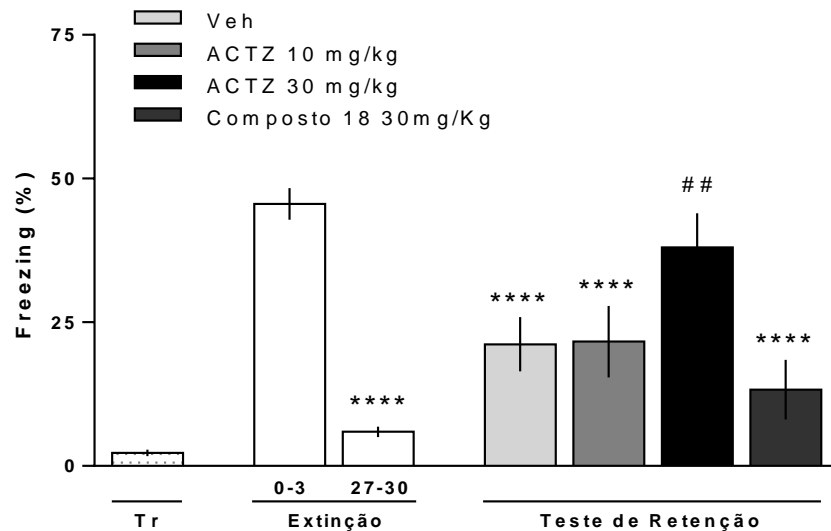
Com o objetivo de verificar a participação das anidrases carbônicas no processo de extinção da memória de medo condicionado ao contexto, animais foram submetidos a uma

sessão de treino na tarefa de MCC. Vinte e quatro horas após, os mesmos retornaram para a caixa de condicionamento para uma sessão de treino de extinção com duração de 15 ou 30 min. Depois de 24 horas, os animais foram submetidos ao teste de retenção da memória de extinção por 180 s (DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2013b; FIORENZA et al., 2012).

3.1 Participação das anidrases carbônicas na consolidação da memória de extinção de MCC

Com o intuito de verificar a participação das AC na consolidação da memória de extinção de MCC, imediatamente após a sessão de treinamento de extinção de 30 min, os animais receberam a administração i.p. de Veh ou de inibidores das AC, C18 (30 mg/Kg) ou ACTZ (10 mg/Kg ou 30 mg/Kg). Conforme observado na fig. 6, os animais que receberam ACTZ na dose de 10 mg/Kg ou C18 na dose de 30 mg/Kg, apresentarem tempos de imobilidade semelhantes ao grupo controle (Veh) no teste de retenção. Em contrapartida, os animais que receberam ACTZ na dose de 30 mg/Kg demonstraram um tempo de imobilidade superior ao grupo Veh no teste de retenção, indicando que a inibição das anidrases carbônicas prejudica a consolidação da memória de extinção de medo condicionado ao contexto de uma maneira dose-dependente e através de um mecanismo central de ação, uma vez que somente a ACTZ é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica.

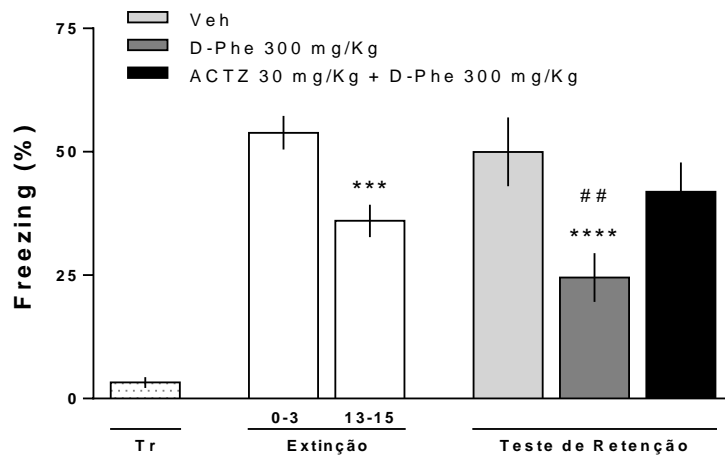
Figura 6: Efeito da inibição das anidrases carbônicas sobre a consolidação da memória de extinção de MCC



Animais foram submetidos a uma sessão de treino na tarefa de MCC (Tr) e 24 h após foram submetidos a uma sessão de extinção de 30 min. Imediatamente após, os animais receberam a administração i.p. de Veh, C18 (30 mg/Kg) ou ACTZ (10 ou 30 mg/Kg). Após 24 h os animais foram submetidos ao teste de retenção de 180 s da memória de extinção. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da porcentagem de tempo total de *freezing*. **** $p < 0,0001$ vs. os primeiros 3 min da sessão de extinção de MCC. ## $p < 0,01$ vs. grupo Veh no teste de retenção. ANOVA de uma via seguida do Teste de Newman-Keuls. $n = 8$ animais por grupo experimental.

Visto que a inibição das anidrases carbônicas prejudica a consolidação da memória de extinção de medo condicionado ao contexto, pensou-se que a ativação desse grupo de enzimas levasse à facilitação da consolidação dessa memória. A fim de comprovar essa hipótese, imediatamente após uma sessão de treinamento de extinção de 15min, os animais receberam a administração i.p. de Veh ou do ativador das AC D-fenilalanina (300 mg/Kg). Conforme demonstrado na fig. 7, os animais que receberam D-Phe apresentaram um tempo de imobilidade inferior ao grupo Veh no teste de retenção. Essa facilitação na consolidação da memória de extinção de MCC foi bloqueada pela administração i.p. de D-Phe (300 mg/Kg) mais ACTZ (30 mg/Kg), uma vez que os tempos de *freezing* desses animais foram semelhantes ao grupo Veh no teste de retenção. O bloqueio na ação da D-Phe pelo inibidor ACTZ demonstra que a melhora da memória de extinção de MCC também se dá através de um mecanismo de atuação central.

Figura 7: Efeito da ativação das anidrases carbônicas sobre a memória de extinção de MCC

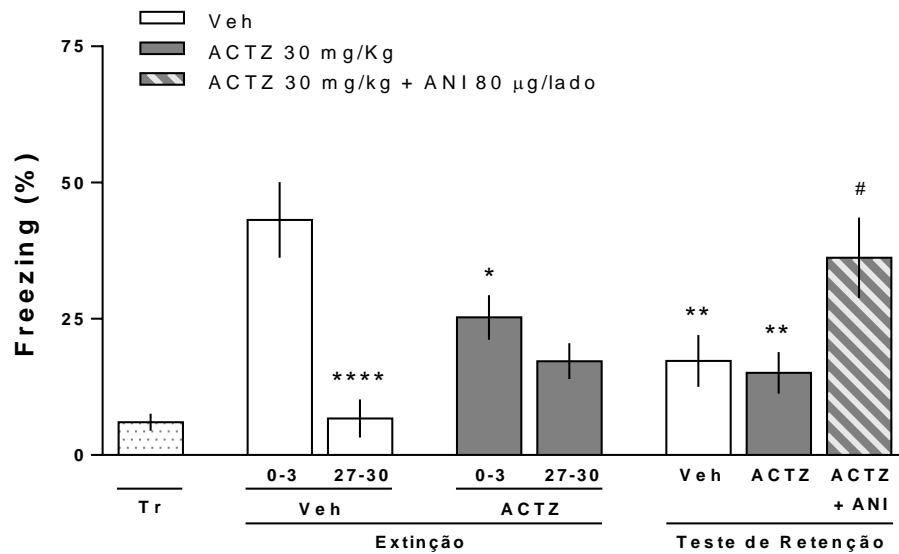


Animais foram submetidos a uma sessão de treino na tarefa de MCC (Tr) e 24 h após foram submetidos a uma sessão de extinção de 15 min. Imediatamente após, os animais receberam a administração i.p. de Veh, D-Phe (300 mg/Kg) ou ACTZ (30 mg/Kg) + D-Phe (300 mg/Kg). Após 24 h os animais foram submetidos ao teste de retenção de 180 s da memória de extinção. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da porcentagem de tempo total de *freezing*. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. os primeiros 3 min da sessão de extinção de MCC. ## $p < 0,01$ vs. grupo Veh no teste de retenção. ANOVA de uma via seguida do Teste de Newman-Keuls. $n = 8$ animais por grupo experimental.

3.2 Participação das anidrases carbônicas na aquisição da memória de extinção de MCC

Com o intuito de investigar a participação das AC no processo de aquisição da memória de extinção de MCC, 10 min previamente à sessão de extinção de 30 min, os animais receberam a administração i.p. de Veh ou ACTZ na dose de 30 mg/Kg. Conforme observado na fig. 8, os animais que receberam ACTZ apresentaram um tempo de imobilidade inferior ao grupo Veh na sessão de extinção, apresentando, no teste de retenção, níveis de *freezing* similares ao grupo Veh. Com o intuito de verificar se a ACTZ havia causado um prejuízo na aquisição da memória de extinção de MCC, animais receberam a infusão intra-CA1 do inibidor de síntese de proteínas, Anisomicina (80 μ g/lado), imediatamente após a sessão de extinção. Como demonstrado abaixo, esses animais exibiram um tempo de imobilidade superior ao grupo Veh no teste de retenção, demonstrando que esses animais foram capazes de adquirir a memória de extinção de MCC, mesmo sem a evocação da memória de MCC.

Figura 8: Efeito da inibição das anidrases carbônicas sobre a aquisição da memória de extinção de MCC

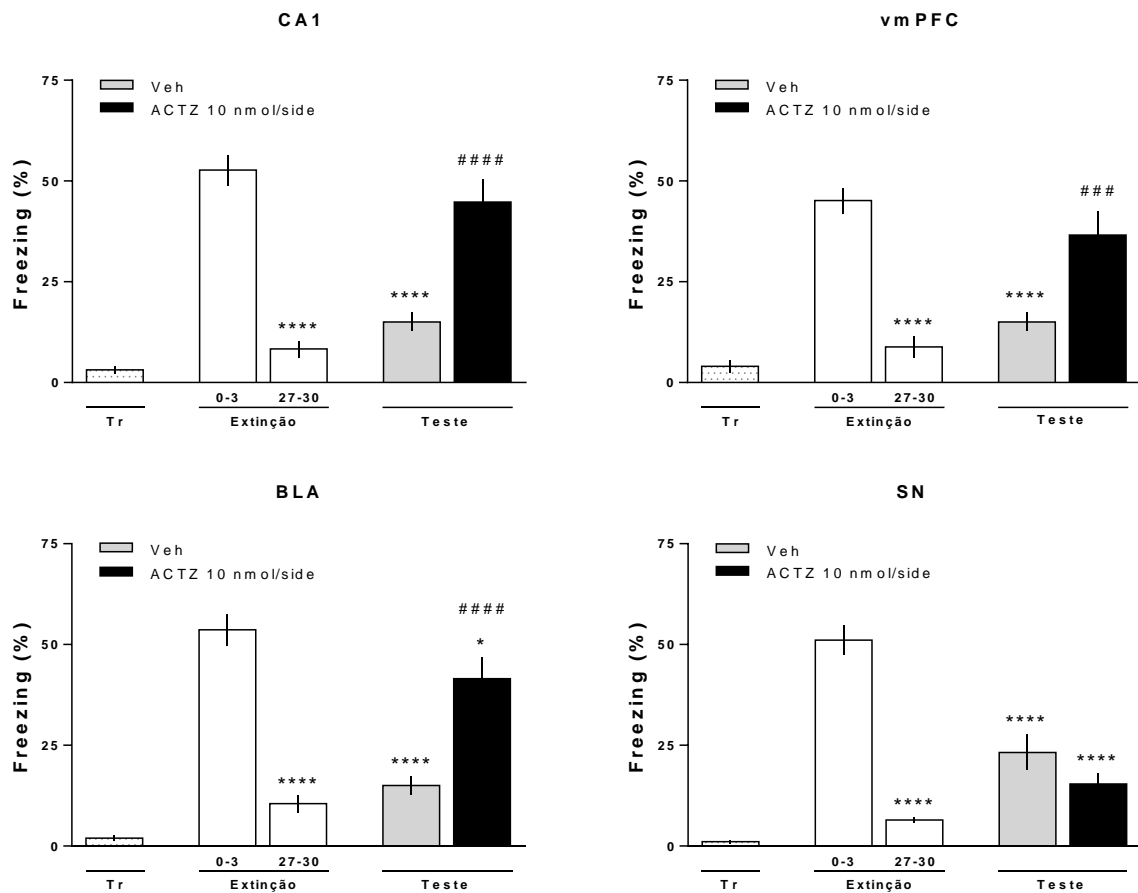


Animais foram submetidos a uma sessão de treino na tarefa de MCC (Tr) e 24 h após foram submetidos a uma sessão de extinção de 30 min. 10 min antes do treinamento de extinção, animais receberam a administração i.p. de Veh ou ACTZ (30 mg/Kg). Imediatamente após a sessão de extinção, um grupo de animais recebeu a infusão intra-CA1 de Ani (80 µg/lado). Após 24 h os animais foram submetidos a um teste de retenção de 180 s da memória de extinção de MCC. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da porcentagem de tempo total de *freezing*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ vs. os primeiros 3 min da sessão de extinção. # $p < 0,05$ vs. grupo Veh no teste de retenção. ANOVA de uma via seguida do Teste de Newman-Keuls. $n = 8$ animais por grupo experimental.

3.1 Participação das anidrases carbônicas cerebrais na consolidação da memória de extinção de MCC

Visto que a inibição das anidrases carbônicas prejudica a extinção da memória de MCC através de um mecanismo de ação central e não periférico, buscou-se elucidar quais regiões cerebrais estariam envolvidas nesse processo. Para isto, imediatamente após a sessão de extinção os animais receberam infusões intra-CA1, -vmPFC, -BLA e -SN de Veh ou ACTZ na dose de 10 nmol/lado. Conforme pode ser observado na fig. 9, os animais que receberam infusões de ACTZ intra-CA1, -vmPFC e -BLA, apresentaram um tempo de imobilidade superior ao grupo Veh na sessão de teste de retenção, indicando que as AC destas três regiões cerebrais participam da consolidação da memória de extinção de MCC. Interessantemente, os animais que receberam infusões de ACTZ intra-SN demonstraram um tempo de imobilidade similar ao grupo controle, o que indica que apenas as anidrases carbônicas de regiões cerebrais fortemente envolvidas com o aprendizado e a memória participam da extinção da memória de MCC.

Figura 9: Efeitos da inibição das anidrases carbônicas cerebrais sobre a consolidação da memória de extinção de MCC

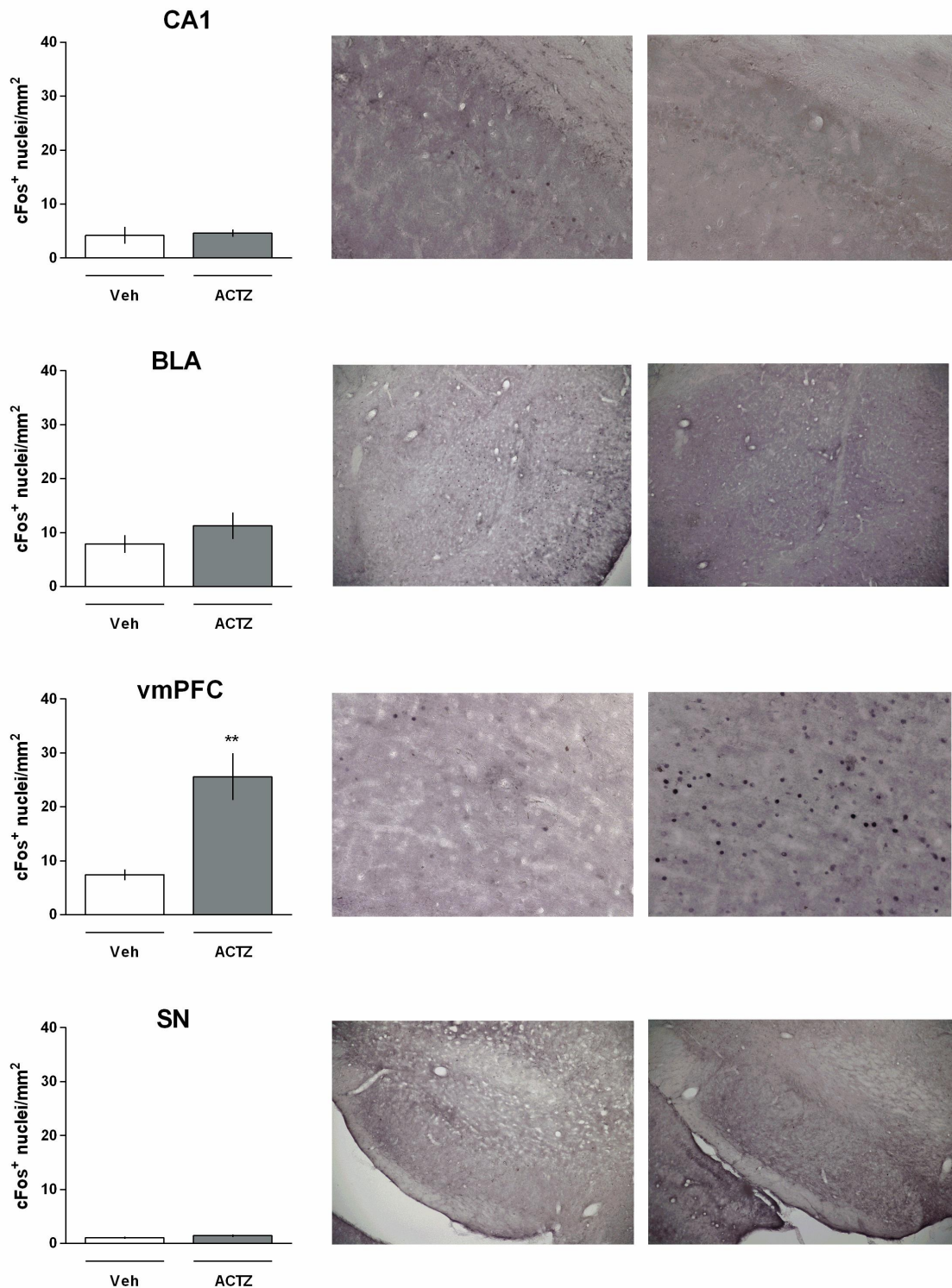


Animais foram submetidos a uma sessão de treino na tarefa de MCC (Tr) e 24 h após foram submetidos a uma sessão de treinamento de extinção (Ext) de 30 min. Imediatamente depois, os animais receberam infusões intra-CA1, -vmPFC, -BLA ou -SN de ACTZ (10 nmol/lado). Após 24 h os animais foram submetidos a um teste de retenção de 180 s da memória de extinção de MCC. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da porcentagem de tempo total de *freezing*. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ vs. os primeiros 3 min do treino de extinção. ### $p < 0,001$, #### $p < 0,001$ vs. grupo Veh no teste de retenção. ANOVA de uma via seguida do Teste de Newman-Keuls. $n = 7-10$ animais por grupo experimental.

3.2 Expressão de c-Fos após inibição das anidrases carbônicas cerebrais

Com o objetivo de investigar a expressão de c-Fos nas regiões CA1, vmPFC, BLA e SN, ratos que receberam a infusão de Veh ou ACTZ nessas áreas, imediatamente após o treino de extinção de 30 min, foram decapitados 90 min após a evocação da memória de extinção de MCC. Fatias das respectivas áreas cerebrais foram submetidas à técnica de Imuno-histoquímica. A fig. 10 demonstra um aumento na expressão de c-Fos na região do vmPFC, o qual não foi observado nas demais regiões cerebrais estudadas.

Figura 10: Expressão de c-Fos nas regiões CA1, BLA, vmPFC e SN após a evocação da memória de extinção de MCC



Animais foram submetidos a uma sessão de treino na tarefa de MCC e 24 h após foram submetidos a uma sessão de treinamento de extinção de 30 min. Imediatamente depois, os animais receberam a administração i.p. de Veh ou ACTZ (30 mg/Kg) e, após 24 h, os animais foram submetidos a um teste de retenção de 180 s da memória de extinção. Noventa min após o teste, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca e seus cérebros foram coletados com o intuito de avaliar a expressão da proteína c-Fos nas regiões cerebrais de interesse através da técnica de imuno-histoquímica em *free-floating*. ** p < 0,01 vs. grupo Veh. Teste t de Student. n = 5 animais por grupo experimental.

4 DISCUSSÃO

A extinção de uma memória é a abordagem mais efetiva para o tratamento de transtornos psiquiátricos caracterizados pela evocação recorrente de memórias de medo (BECKETT, 2002; DAVIS et al., 2006; DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2013; QUIRK et al., 2010). Por ser um novo aprendizado que se sobrepõe à memória original, o processo de extinção envolve mecanismos celulares e moleculares semelhantes àqueles inicialmente recrutados na fase de consolidação (DAVIS, 2002; FISCHER et al., 2007; SANTINI; MULLER; QUIRK, 2001; SCHAFE; LEDOUX, 2000; SZAPIRO et al., 2003; VIANNA et al., 2001). Evidências recentes sugerem que as enzimas anidrases carbônicas participam da aquisição e consolidação da memória de medo (YANG et al., 2013), entretanto, até o momento, o envolvimento das mesmas no processo de extinção dessa memória era totalmente desconhecido.

No presente estudo, demonstrou-se pela primeira vez a participação das anidrases carbônicas no processo de extinção da memória de medo ao contexto. Os resultados observados mostram que a ativação desse importante grupo de enzimas pela administração intraperitoneal de D-fenilalanina facilita a consolidação da memória de extinção de MCC. Em contrapartida, o inibidor das AC acetazolamida prejudica a consolidação da memória de extinção de MCC quando administrado i.p., fato este que não ocorre com a administração i.p. de outro inibidor, o C18. Uma vez que somente a ACTZ atravessa a barreira hematoencefálica, os resultados obtidos sugerem que as AC modulam a extinção da memória de medo através de um mecanismo central de ação. Experimentos subsequentes revelaram que essa ação se dá através da inibição das AC em áreas cerebrais cruciais para o aprendizado e a memória, como a região CA1 do hipocampo dorsal, amígdala basolateral e córtex pré-frontal ventromedial. Isto porque na substância *nigra*, uma região cerebral necessária para a consolidação (BALDI; MARIOTTINI; BUCHERELLI, 2007), porém não para a extinção da memória de medo ao contexto (BALDI; BUCHERELLI, 2010), a inibição das AC não afetou o processo de extinção dessa memória.

Os dados obtidos no presente trabalho mostram ainda que a inibição das AC prejudica somente a consolidação da memória de extinção de MCC, mas não a sua aquisição. Embora os animais tratados com ACTZ antes da sessão de extinção terem demonstrado um prejuízo na evocação da memória de MCC, eles foram capazes aprender a memória de extinção de medo condicionado ao contexto. Este achado está de acordo com a literatura existente, a qual demonstra que o aprendizado de extinção pode ocorrer mesmo sem a evocação da memória de medo (DE CARVALHO MYSKIW et al., 2015).

Os mecanismos subjacentes à ação das AC no processamento mnemônico permanecem por serem melhor esclarecidos. Estudos indicam que a ativação desse grupo de enzimas promove a rápida elevação das concentrações de HCO_3^- em estruturas cerebrais relacionadas com o aprendizado e a memória, como o hipocampo (STALEY; SOLDÓ; PROCTOR, 1995; SUN; ALKON, 2001). Esse aumento no fluxo de bicarbonato promove a alteração do sinal GABAérgico de inibitório para excitatório, modificando assim as respostas neuronais (KAILA et al., 1997; WRIGHT; RAIMONDO; AKERMAN, 2011). Sob essas condições, o neurotransmissor GABA_A ativa um subconjunto de neurônios piramidais e, assim, facilita as memórias associativas (SUN; ALKON, 2002). Mais recentemente, foi demonstrado que a inibição das AC impede a fosforilação das kinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) na amígdala, causando um prejuízo na consolidação da memória de medo (YANG et al., 2013). Corroborando com este achado, outro estudo observou que a ativação das AC facilita a memória de reconhecimento de objetos através da fosforilação das ERK1 e ERK2 no córtex e no hipocampo (CANTO DE SOUZA et al., 2017).

Até o momento, não foi identificada nenhuma isoforma capaz de explicar os efeitos observados no aprendizado e na memória decorrentes da modulação das AC, o que se deve, principalmente, ao fato de não existirem inibidores específicos para as mesmas (SUPURAN, 2008). Apesar disto, uma AC associada à membrana recentemente descoberta tem sido fortemente associada à transmissão sináptica excitatória. A isoforma XIV é amplamente expressa no cérebro humano e de roedores, onde auxilia na regulação do pH intra e extracelular. A sua presença foi observada nos axônios e membranas neuronais em regiões específicas do cérebro de ambas as espécies, incluindo o hipocampo (NISHIMORI et al., 2005; PARKKILA et al., 2001). Essas descobertas fazem da isoforma XIV um forte candidato para a atividade extracelular das AC, o que explicaria o fato dos seus inibidores favorecerem o deslocamento alcalino extracelular associado com a transmissão sináptica (PARKKILA et al., 2001).

Para finalizar, os animais que demonstraram um prejuízo na consolidação da memória de extinção de MCC após a inibição das AC no vmPFC, apresentaram um aumento na expressão de c-Fos nessa região após a evocação da memória de extinção de MCC. Quando um neurônio é ativado, ocorre o surgimento de genes de ativação imediata, como por exemplo o c-Fos (KACZMAREK, 2000). Por esse motivo, a proteína codificada por esse gene é considerada um importante marcador de atividade neuronal, cuja expressão é amplamente estudada na pesquisa científica (GALLO et al., 2018).

O que se sabe, até o momento, com relação à expressão de c-Fos envolvida nos processos de aprendizagem e memória, não permite elucidar o seu real papel fisiológico no

processamento mnemônico, resultando difícil explicar o surpreendente achado aqui obtido. Entretanto, há relatos de reduzida expressão de c-Fos na amígdala em animais capazes de aprender a memória de extinção, bem como evidências de elevada expressão de c-Fos no córtex pré-frontal pré-límbico em animais incapazes de aprender a memória de extinção (BRAVO-RIVERA et al., 2015). Corroborando com esse estudo, outros demonstram que a persistência da memória de medo está associada a um aumento na expressão de c-Fos no hipocampo, indicando que uma fase tardia de transcrição é essencial para a manutenção de uma memória dependente do hipocampo (KATCHE et al., 2010; KATCHE; MEDINA, 2017).

Em conjunto, os resultados aqui obtidos são de extrema relevância pois (i) reforçam a presença das AC em regiões cerebrais variadas, (ii) demonstram a participação de novos substratos neurais no processo de extinção da memória de medo e (iii) permitem um importante avanço na compreensão do papel das AC no processamento mnemônico. Uma vez que compostos capazes de modular a atividade das AC, sobretudo inibidores, vem sendo propostos como fortes candidatos para o tratamento de diversas condições clínicas, os achados deste trabalho indicam que estes moduladores podem também serem alvos potenciais para o desenvolvimento de futuras drogas que visam o tratamento de distúrbios caracterizados por alterações nas respostas de medo.

***CAPÍTULO IV:
EFEITOS DO ESTRESSE SOCIAL E DE UMA DIETA RICA
EM VITAMINA A E ÔMEGA-3 SOBRE A CONSOLIDAÇÃO
DA MEMÓRIA DE MEDO AO CONTEXTO***

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos, a curto e longo prazo, do estresse de instabilidade social na adolescência e do consumo de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre o processamento da memória de medo condicionado ao contexto.

1.2 Objetivos específicos

Verificar as consequências do estresse de instabilidade social na adolescência e do consumo de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre o ganho de peso corporal, quantidade de dieta consumida, comportamento de anedonia, atividade locomotora e nível de ansiedade, na fase da adolescência e na idade adulta.

Verificar as consequências do estresse de instabilidade social na adolescência e do consumo de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre o processo de consolidação da memória de medo condicionado ao contexto, na fase da adolescência e na idade adulta.

Verificar a expressão do BDNF nas regiões cerebrais do hipocampo, amígdala e córtex frontal, de animais adolescentes e adultos, submetidos ao estresse de instabilidade social na adolescência e ao consumo de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3.

2 MÉTODOS

2.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos com 30 dias de idade, pesando em média 70 g. Os mesmos foram adquiridos da empresa europeia *Charles River Laboratories* e entregues no biotério da *Università degli Studi di Firenze*, Itália. Os animais foram mantidos em caixas plásticas especiais, forradas com maravalha e com capacidade para até 2 animais. Os mesmos foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas (luz a partir das 7:00 horas e escuro a partir das 19:00 horas), com água e comida à vontade, à uma temperatura ambiente constante de 23°C. Todos os procedimentos foram realizados somente após a aprovação dos mesmos no Ministério da Saúde da Itália, sob o número de autorização 649/2017.

2.2 Grupos experimentais e composição das dietas

De acordo com o protocolo utilizado e a dieta fornecida, no 28º dia pós-natal (PND), os animais foram divididos em três grupos experimentais: não estressado com dieta controle (NSCD), estressado com dieta controle (SCD) e estressado com dieta enriquecida (SED). Os *pellets* de ambas as dietas possuíam o mesmo aspecto, coloração e odor, sendo diferentes apenas com relação a sua composição (Tabelas 1 e 2). Além de uma quantidade superior de vitamina A em sua formulação, a dieta enriquecida apresentava os ácidos graxos ômega-3 EPA e DHA, os quais não estavam presentes na dieta controle.

Tabela 1: Composição da dieta controle

Nutrientes brutos	(%)	Aditivos	(por Kg)
Proteínas brutas	17.6	Vitamina A [IU]	5.000
Gordura bruta	5.1	EPA/DHA (mg)	-
Fibra bruta	5.0	Vitamina D ₃ [IU]	1.000
Matéria mineral	5.4	Vitamina E [mg]	75
Amido	36.1	Vitamina K ₃ [mg]	4
Açúcar	11.1	Cobre [mg]	11

Tabela 2: Composição da dieta enriquecida

Nutrientes brutos	(%)	Aditivos	(por Kg)
Proteína bruta	17.6	Vitamina A [IU]	45.000
Gordura bruta	5.1	EPA/DHA (mg)	5.450
Fibra bruta	5.0	Vitamina D ₃ [IU]	1.000
Matéria mineral	5.4	Vitamina E [mg]	75
Amido	36.1	Vitamina K ₃ [mg]	4
Açúcar	11.1	Cobre [mg]	11

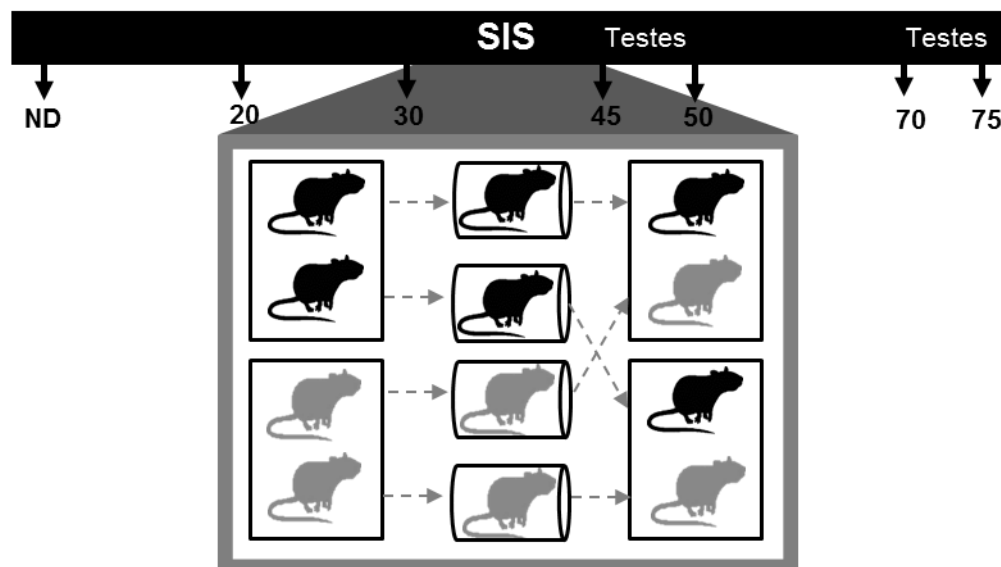
2.3 Controle do peso corporal e do consumo das dietas

Com o intuito de controlar o ganho de peso corporal dos animais, bem como a quantidade consumida de dieta controle e dieta rica em vitamina A e ômega-3, os animais e a dieta fornecida foram pesados diariamente durante todo o experimento (MCCORMICK et al., 2012).

2.4 Protocolo de Estresse de Instabilidade Social

O protocolo de estresse de instabilidade social (SIS) utilizado no presente trabalho consiste na associação de dois estímulos estressores (MORRISSEY; MATHEWS; MCCORMICK, 2011). Do 30º ao 45º dia de vida do animal, os mesmos foram submetidos diariamente a uma sessão de isolamento por 1 hora, período no qual eles eram colocados em pequenos cilindros de acrílico de cerca de 10 cm de diâmetro. Esse tipo de estresse é conhecido como estresse por contenção, uma vez que impede que o animal se movimente livremente. Todos os dias, após o período de isolamento, os animais foram imediatamente colocados em uma nova caixa moradia, sempre com um companheiro desconhecido, com o qual eles não haviam tido contato anteriormente, mas que também havia sido submetido ao estresse por contenção (Figura 11). Esse protocolo associa dois fatores estressores para impedir que (i) os animais se habituem ao estresse de isolamento e (ii) que os mesmos criem laços sociais com o intuito de combater esse estresse. Para verificar os efeitos imediatos do estresse de instabilidade social, os animais foram submetidos à diferentes tarefas comportamentais na idade adolescente. Com o intuito de verificar os efeitos do estresse de instabilidade social a longo prazo, outro grupo de animais foi submetido às diferentes tarefas comportamentais na idade adulta.

Figura 11: Esquema ilustrativo do protocolo de estresse de instabilidade social



Fonte: O autor (2018).

2.5 Teste de Preferência a Sacarose

A anedonia pode ser definida como a diminuição ou a perda da capacidade de sentir prazer, ou ainda a falta de reatividade a estímulos prazerosos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). A anedonia está frequentemente associada à depressão e esquizofrenia, podendo ocorrer também em muitas outras condições clínicas (LAMBERT et al., 2018; WILLNER, 1997).

A anedonia é uma resposta comportamental amplamente avaliada em diversos modelos pré-clínicos através do teste de preferência a sacarose, o qual consiste em um protocolo de livre escolha entre duas soluções, água e sacarose (DER-AVAKIAN; MARKOU, 2012; WILLNER et al., 1987). Extensivamente utilizado para avaliar os efeitos induzidos pelo estresse, este teste indica a presença de anedonia através da diminuição do consumo da solução de sacarose (RYGULA et al., 2005; WILLNER, 2005).

No protocolo aqui utilizado, os animais foram inicialmente habituados a duas garrafas de água durante 24 horas. Após esse período, os animais foram submetidos a um jejum de 5 horas, o qual foi caracterizado pela ausência de água e comida (WILLNER et al., 1987). Passado esse período, foi oferecido aos animais, *overnight*, a escolha entre uma garrafa contendo água ou outra contendo solução de sacarose 1%. As garrafas foram pesadas antes do teste e após o seu término (RYGULA et al., 2005). O consumo das duas soluções foi medido através da diferença de peso das garrafas (SLATTERY; MARKOU; CRYAN, 2007).

2.6 Teste de Campo Aberto

Entre os diversos testes comportamentais para avaliar a atividade locomotora e o nível de ansiedade dos animais, a tarefa de campo aberto é um dos mais utilizados. Com base nos estudos de Hall (1934), o teste se popularizou como uma forma de avaliação do comportamento exploratório (FURINI et al., 2015; REBOUÇAS; SCHMIDEK, 1997; SCHMITT; HIEMKE, 1998).

Este teste comportamental consiste em confrontar o animal com um ambiente novo e observar os seus movimentos locomotores. Durante um determinado período de tempo, diferentes padrões deambulação do animal são registrados, como por exemplo a distância percorrida e a permanência na região periférica e central do campo aberto (PRUT; BELZUNG, 2003). Diferenças na distância percorrida podem indicar a presença de algum tipo de prejuízo locomotor, enquanto que o deslocamento entre as regiões central e periférica é um excelente

parâmetro para avaliar o estado de ansiedade do animal, uma vez que o animal ansioso prefere permanecer nas zonas periféricas de uma determinada área (EILAM, 2003; PRUT; BELZUNG, 2003)

No presente trabalho, a fim de verificar se a atividade locomotora e o nível de ansiedade dos animais, os mesmos foram submetidos ao teste de campo aberto. O aparato utilizado nesta tarefa consiste em uma arena de acrílico com dimensões de 60 x 40 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura). O animal foi colocado na arena e, durante 10 min, analisou-se a distância percorrida, o tempo de permanência nas zonas central e periférica, bem como o número de vezes que o animal cruzava o perímetro determinado para ser a zona central.

2.7 Condicionamento Clássico

Método descrito anteriormente. Ver item 2.3 do Capítulo II, pág. 43.

2.7.1 Protocolo de consolidação da memória de MCC

Método descrito anteriormente. Ver item 2.4.1 do Capítulo II, pág. 44.

2.8 Western blot para verificação da expressão do BDNF

A técnica de *Western blot* foi realizada com o intuito de avaliar a expressão do BDNF nas regiões cerebrais de interesse após a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto. Noventa min após o teste de retenção da memória de MCC, animais foram sacrificados por decapitação na adolescência ou na idade adulta. Seus cérebros foram removidos, lavados com solução salina 0,9% a temperatura de 4°C e as regiões cerebrais do hipocampo, córtex frontal e amígdala foram dissecadas. Após, essas estruturas foram individualmente armazenadas em tubos de *ependorfs* contendo *Lysis Buffer Working Solution* a 4°C e homogeneizadas através de um processador ultrassônico até a obtenção de amostras totalmente homogêneas, as quais foram mantidas a -80°C para posterior utilização (FABBRI et al., 2016).

Para o doseamento proteico das amostras, utilizou-se o *PierceTM BCA Protein Assay Kit* (*Thermo Scientific*), o qual continha uma solução colorante e uma solução padrão de albumina na concentração de 2 mg/mL. A partir desta, sucessivas diluições foram realizadas a fim de preparar a curva de calibração. As concentrações das mesmas variaram de 0 a 2000 ug/mL. Por

sua vez, as diluições das amostras foram feitas na proporção 1:10. Todas as diluições foram aplicadas em triplicata na placa de Elisa. Ao final, cada poço da placa possuía o volume de 100 μ l, ao qual foi adicionado outros 100 μ l de colorante. Após um período de 30 min ao abrigo da luz, as absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro. A partir dos valores de absorbância, determinou-se a curva de calibração e o coeficiente de correlação. Com base na curva obtida, os valores de absorbância das amostras foram interpolados e a quantidade de proteínas presente em cada uma delas foi determinada (BENETTI et al., 2015).

Segundo o resultado do doseamento, preparou-se as amostras com um tampão de carregamento e PB para posterior desagregação e desnaturação das proteínas. Para tal, utilizou-se a técnica de eletroforese em gel. Alíquotas contendo 80 μ g de proteína totais foram carregadas em um gel de SDS-acrilamida (SDS-PAGE) e a eletroforese foi realizada (120 min; 80-100 V). Após a separação, as proteínas foram transferidas (120 min; 100 V) para membranas de nitrocelulose. Uma vez realizada a transferência, as membranas foram submetidas às seguintes etapas: lavagem de 10 min, bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos com solução BSA 5% durante 2 h, lavagens de 10 min, incubação *overnight* com anticorpo primário para BDNF (1:1.000), lavagens de 10 min, incubação com anticorpo secundário para BDNF (1:5.000) durante 2 h e lavagens de 10 min. As bandas imunorreativas foram reveladas por quimioluminescência através do reagente *LuminataTM Western Chemiluminescent HRP Substrates (Scientific Techniques)* no equipamento de foto documentação *Image Quant*. Após a revelação, os anticorpos previamente utilizados foram removidos das membranas com o auxílio de uma solução de Hidróxido de Sódio 1M. As membranas foram, então, novamente incubadas com anticorpos para tubulina, a qual foi utilizada como controle interno pois, sendo uma proteína estrutural, sua expressão é detectada em todas as amostras. A densidade óptica de todas as bandas foi determinada por densitometria quantitativa através do software *Quantity One*. Os valores obtidos nas bandas do BDNF foram normalizados para os valores obtidos nas bandas de tubulina pela razão das densidades ópticas BDNF/tubulina. Essas razões foram expressas como porcentagem da média das razões obtidas a partir do grupo controle (BENETTI et al., 2015; FABBRI et al., 2016).

2.9 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software Prism Graph-Pad 5.1. Os dados obtidos a partir do ganho de peso corporal e dieta consumida no 45° e 70° PND, foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. Os

dados obtidos a partir do ganho de peso corporal e dieta consumida durante todo o experimento, bem como os dados dos testes de preferência a sacarose e campo aberto, foram analisados através da ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. Os dados obtidos na tarefa de medo condicionado ao contexto foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os dados obtidos através da técnica de *Western Blot* para verificação da expressão do BDNF foram analisados a partir das médias das amostras de cada animal, através da ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

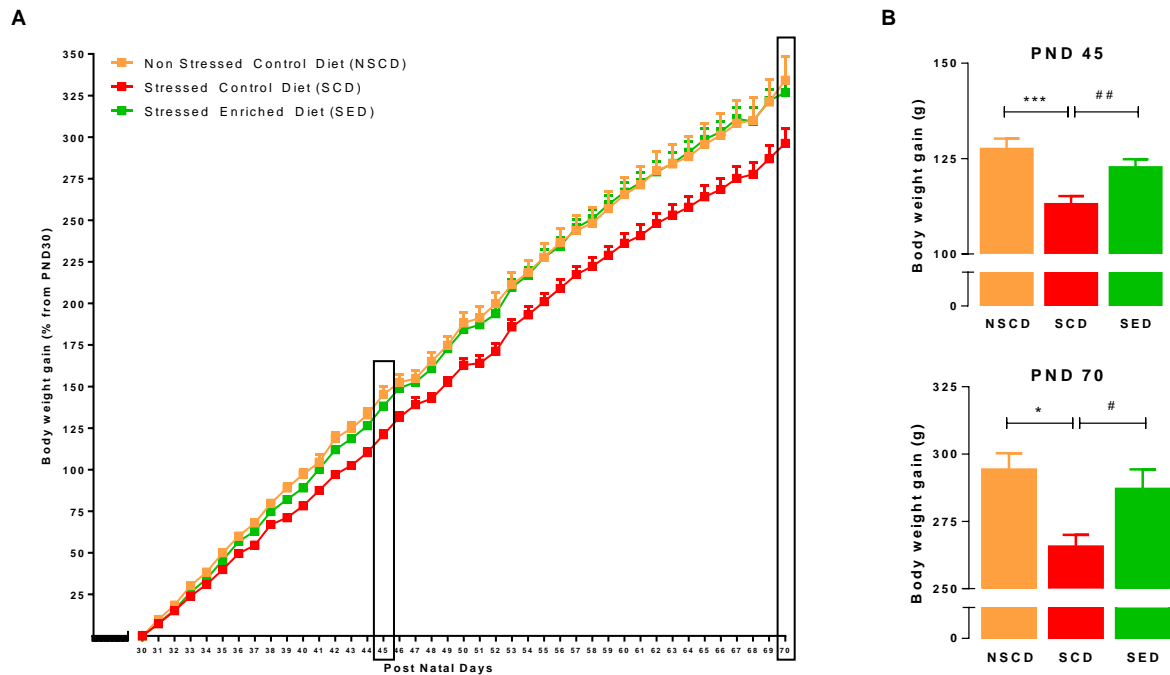
3 RESULTADOS

Com o objetivo de verificar, a curto e longo prazo, as consequências do estresse de instabilidade social sobre o processamento da memória de medo condicionado ao contexto, bem como os efeitos de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 nesse processo, animais adolescentes foram submetidos ao protocolo de SIS durante 15 dias consecutivos. Imediatamente após esse período ou na idade adulta, os animais foram submetidos a uma sessão de treino na tarefa de MCC. Vinte e quatro horas após, os mesmos retornaram para a caixa de condicionamento para o teste de retenção da memória de MCC (SCHMIDT et al., 2017).

3.1 Efeitos do estresse de instabilidade social e do consumo de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre o ganho de peso corporal e a quantidade de dieta consumida

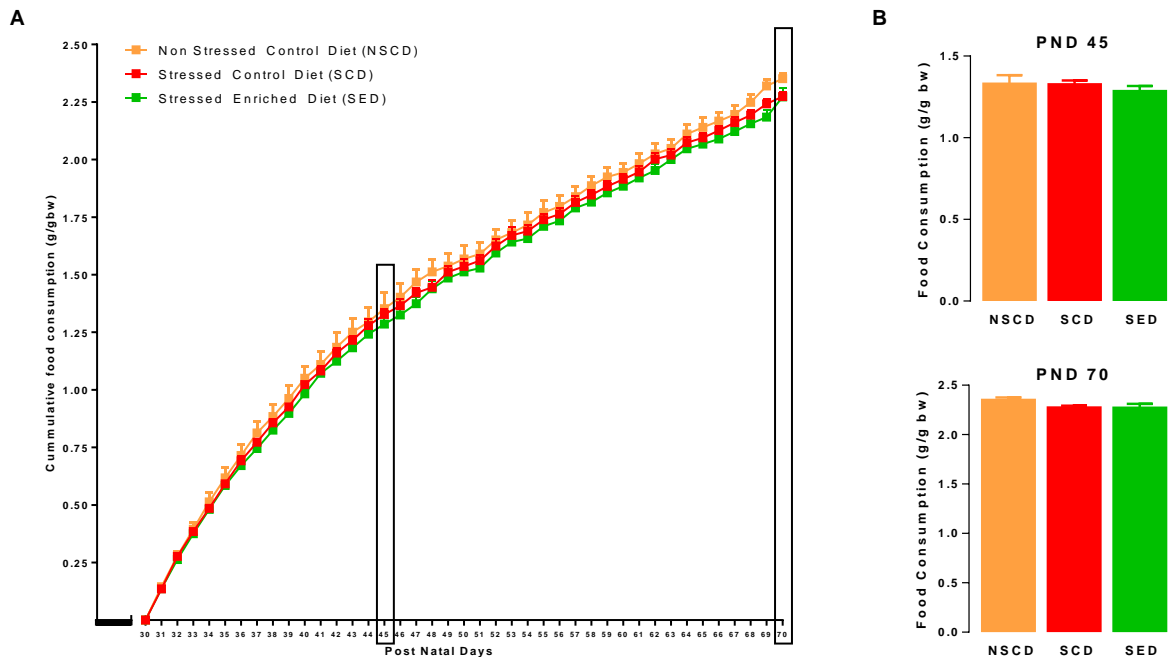
O acompanhamento do ganho de peso corporal dos animais foi realizado diariamente do 30º ao 70º dia pós-natal. Durante esse período, a quantidade de comida por eles ingerida também foi monitorada (MCCORMICK et al., 2012) A fig. 12 demonstra que o estresse de tipo social interfere no ganho de peso corporal. Uma significativa redução no ganho de peso foi observada nos animais estressados com a dieta controle em comparação aos animais não estressados com a dieta controle, mesmo não havendo diferenças na quantidade de dieta ingerida (fig. 12). A dieta rica em vitamina A e ômega-3 preveniu a diminuição no ganho de peso causada pela exposição ao SIS, tanto na adolescência quanto na idade adulta.

Figura 12: Efeitos do estresse de instabilidade social e de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre o ganho de peso corporal na adolescência e idade adulta



Animais foram submetidos ao protocolo de estresse de instabilidade social do 30^o ao 45^o PND. Parâmetros comportamentais foram avaliados na adolescência e na idade adulta. Os animais foram pesados diariamente durante todo o experimento. Os dados acima estão apresentados como média \pm erro padrão da porcentagem de peso corporal adquirido (A) e do peso corporal adquirido até o 45^o e 70^o PND (B). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. o grupo indicado. (A) ANOVA de duas vias seguida do Teste de Bonferroni. (B) ANOVA de uma via seguida do Teste de Bonferroni. $n = 10-16$ animais por grupo experimental.

Figura 13: Efeitos do estresse de instabilidade social e de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre a quantidade de dieta consumida na adolescência e idade adulta

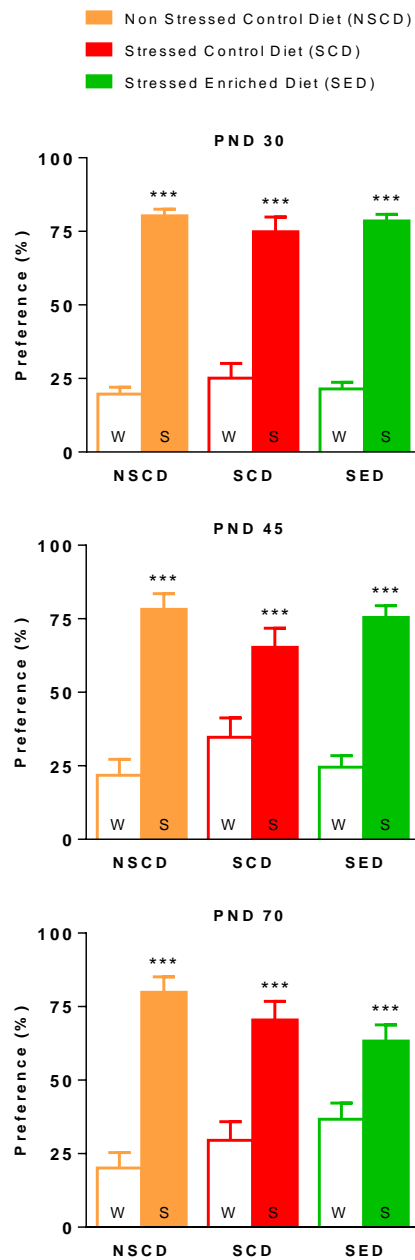


Animais foram submetidos ao protocolo de estresse de instabilidade social do 30° ao 45° PND. Parâmetros comportamentais foram avaliados na adolescência e na idade adulta. O consumo de comida acumulado foi medido diariamente durante todo o experimento. Os dados acima estão apresentados como média \pm erro padrão do consumo de comida acumulado durante todo o experimento (A) e até o 45° e 70° PND (B). (A) ANOVA de duas vias seguida do Teste de Bonferroni. (B) ANOVA de uma via seguida do Teste de Bonferroni. $n = 10-16$ animais por grupo experimental.

3.1 Efeitos do estresse de instabilidade social e do consumo de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre o comportamento de anedonia

O teste de preferência a sacarose foi realizado em três períodos distintos: um dia antes do início do SIS, imediatamente após o seu término (quando os animais estavam na adolescência) e também na idade adulta. Conforme observado na fig. 14, os animais dos três grupos experimentais demonstraram preferência pela sacarose à água, independentemente da idade e da fase experimental, o que exclui, portanto, a presença de anedonia.

Figura 14: Efeitos do estresse de instabilidade social e de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre o comportamento de anedonia na adolescência e idade adulta

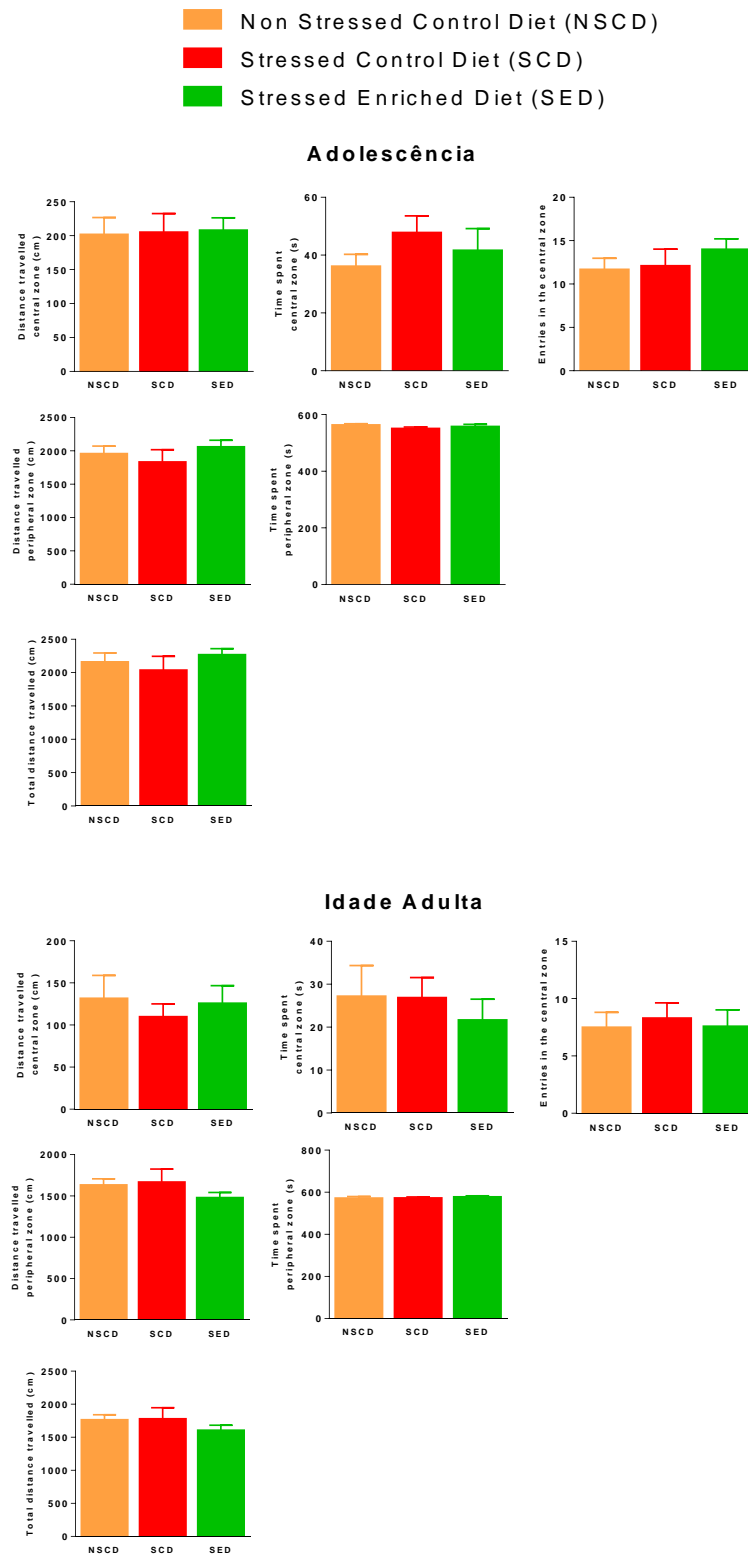


Animais foram submetidos ao protocolo de estresse de instabilidade social do 30° ao 45° PND. O comportamento de anedonia foi avaliado um dia antes do início do estresse, imediatamente depois (na fase da adolescência) e na idade adulta. Os dados acima estão apresentados como média \pm erro padrão da porcentagem de preferência. *** $p < 0,001$ vs. o grupo *Water*. ANOVA de duas vias seguida do Teste de Bonferroni. $n = 10-16$ animais por grupo experimental.

3.1 Efeitos do estresse de instabilidade social e do consumo de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre a atividade locomotora e o nível de ansiedade

Alterações na atividade locomotora e no nível de ansiedade dos animais foram avaliadas através da tarefa comportamental de campo aberto. Como ilustrado na fig.15, não há diferenças significativas entre os três grupos experimentais com relação a distância percorrida nas zonas central e periférica. Da mesma maneira, não se observa diferenças entre o tempo despendido pelos grupos experimentais nas duas áreas do campo aberto, tampouco em relação ao número de entradas na zona central da arena.

Figura 15: Efeitos do estresse de instabilidade social e de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre a atividade locomotora e nível de ansiedade na adolescência e idade adulta

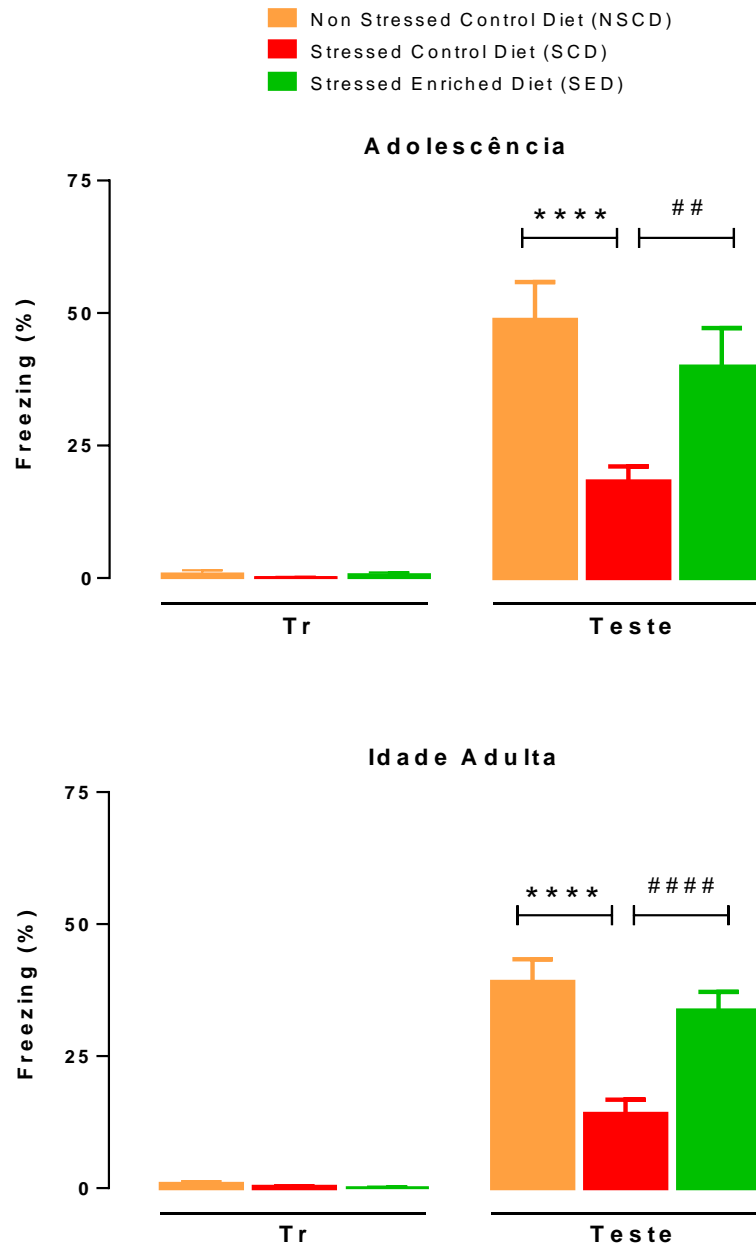


Animais foram submetidos ao protocolo de estresse de instabilidade social do 30^o ao 45^o PND. A atividade locomotora e o nível de ansiedade foram avaliados na adolescência e na idade adulta. Os dados acima estão apresentados como média \pm erro padrão da distância total percorrida, tempo despendido na zona central e periférica e número de entradas na zona central. ANOVA de uma via seguida do Teste de Bonferroni. $n = 10-16$ animais por grupo experimental.

3.1 Efeitos do estresse de instabilidade social e do consumo de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre a memória de MCC

Com o objetivo de investigar, à curto e longo prazo, os efeitos do estresse social sobre a consolidação da memória de medo ao contexto, animais foram submetidos ao protocolo de estresse de instabilidade social do 30º ao 45º PND e à tarefa de MCC na adolescência e na idade adulta. Conforme observado na fig. 16, os animais submetidos ao estresse de instabilidade social e à dieta controle apresentaram um tempo de imobilidade inferior ao grupo não estressado no teste de retenção. Este resultado demonstra um prejuízo, induzido pelo estresse, na consolidação da memória de medo condicionado na adolescência e na idade adulta. Interessantemente, os animais estressados e submetidos à dieta rica em vitamina A e ácidos graxos ômega-3 apresentaram tempos de *freezing* similares ao grupo NSCD, indicando que a dieta enriquecida é capaz de prevenir os déficits causados pelo estresse social em ambas as fases da vida.

Figura 16: Efeitos do estresse de instabilidade social e de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre a consolidação da memória de MCC na adolescência e idade adulta



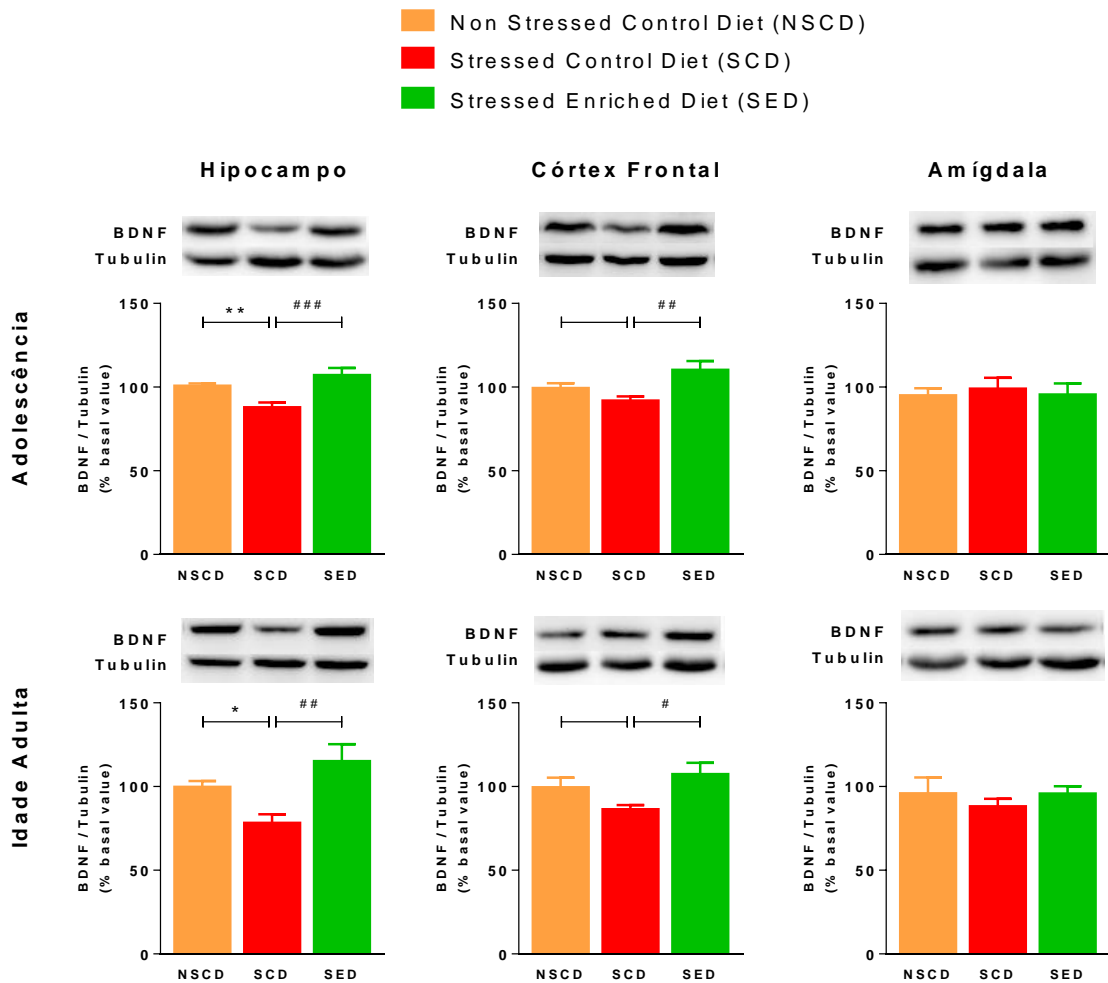
Animais adolescentes e adultos foram submetidos a uma sessão de treino na tarefa de MCC (Tr). Depois de 24 h os mesmos retornaram à caixa de condicionamento para o teste de retenção da memória de MCC (Teste) de 180 s. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da porcentagem de tempo total de *freezing*.

**** $p < 0,0001$, ## $p < 0,01$, ##### $p < 0,0001$ vs. o grupo indicado. ANOVA de uma via seguida do Teste de Newman-Keuls. $n = 10-16$ animais por grupo experimental..

3.1 Efeitos do estresse de instabilidade social e do consumo de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 sobre a expressão do BDNF nas regiões cerebrais do hipocampo, amígdala e córtex frontal

A expressão do BDNF nas regiões do hipocampo, amígdala e córtex frontal foi analisada nos animais adolescentes e adultos, submetidos ou não ao estresse de instabilidade social, bem como a dieta controle ou enriquecida, após a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto. De acordo com a fig. 17, os animais estressados e submetidos à dieta controle apresentaram uma redução na expressão do BDNF na região do hipocampo quando comparados aos animais NSCD, na adolescência e na idade adulta. Surpreendentemente, os animais estressados e submetidos à dieta rica em vitamina A, EPA e DHA, apresentaram níveis do BDNF similares ao grupo NSCD. Estes dados demonstram que a dieta enriquecida é, também, capaz de prevenir o prejuízo observado na expressão do BDNF hipocampal, induzido pelo estresse, em ambas as idades.

Figura 17: Expressão do BDNF nas regiões do hipocampo, amígdala e córtex frontal, de animais adolescentes e adultos, submetidos ao estresse de instabilidade social e a uma dieta rica em vitamina A e ômega-3



Animais adolescentes e adultos foram submetidos a tarefa de MCC. Após 90 min da sessão de teste, os animais foram sacrificados e as regiões cerebrais do hipocampo, córtex frontal e amígdala foram coletadas para posterior análise da expressão do BDNF. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da porcentagem de tempo total de *freezing*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,0001$, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. o grupo indicado. ANOVA de uma via seguida do Teste de Newman-Keuls. $n = 5$ animais por grupo experimental.

4 DISCUSSÃO

Diferentes modelos animais vêm sendo desenvolvidos na tentativa de esclarecer as consequências fisiológicas e comportamentais causadas pela exposição ao estresse, as quais, muitas vezes, resultam no desenvolvimento de severas patologias. Tais modelos permitem ainda o desenvolvimento de formas de prevenção e/ou tratamentos capazes de minimizar os efeitos do estresse sobre o organismo. Dentre os modelos existentes, o de estresse social é amplamente utilizado em virtude da sua semelhança com a rotina vivenciada pela sociedade moderna (TAMASHIRO; NGUYEN; SAKAI, 2005).

No presente trabalho, demonstrou-se que o estresse de instabilidade social no período da adolescência não foi capaz de desencadear alterações motoras e/ou comportamentos tipo depressivos, como anedonia e ansiedade, em nenhuma das faixas etárias analisadas. Esse resultado deve-se, provavelmente, ao fato do protocolo de estresse de instabilidade social aqui utilizado ser um modelo de estresse moderado, ou seja, não forte o suficiente para modificar os parâmetros acima citados. Em contrapartida, observou-se que o SIS interfere no ganho de peso corporal tanto na adolescência quanto na idade adulta. Animais estressados com dieta controle demonstraram uma diminuição no percentual de ganho de peso quando comparados à animais não estressados, mesmo não havendo diferença significativa na quantidade de dieta consumida. Interessantemente, observou-se ainda que o estresse de instabilidade social na adolescência prejudica a consolidação da memória de medo ao contexto nessa faixa etária, prejuízo esse que se mantém na idade adulta.

Além disso, sabendo que o processo de formação das memórias está relacionado com diversos e complexos mecanismos de sinalização nas regiões do córtex frontal, amígdala e hipocampo, verificou-se a expressão do BDNF nessas áreas cerebrais. Os animais estressados com dieta de controle que haviam demonstrado um déficit na consolidação da memória de MCC, também apresentaram uma redução na expressão do BDNF hipocampal, tanto na adolescência quanto na idade adulta.

Na busca por alternativas não medicamentosas capazes de prevenir os déficits induzidos pelo estresse social acima relatados, estudou-se os efeitos de uma dieta rica em vitamina A e ácidos graxos ômega-3. Surpreendentemente, observou-se que o consumo da mesma foi capaz de impedir todos os prejuízos induzidos pelo estresse acima relatados, tanto na adolescência quanto na idade adulta. O déficit no ganho de peso corporal e na consolidação da memória de medo condicionado ao contexto, bem como a redução na expressão do BDNF hipocampal, foram prevenidos em ambos os períodos da vida pelo consumo da dieta enriquecida.

Sabe-se que a alimentação ao estilo mediterrâneo, rica em gorduras saudáveis, vitaminas antioxidantes e fibras, têm sido fortemente associada à redução da incidência de diversas patologias. Entre os nutrientes presentes nesse tipo de dieta, a vitamina A e os ácidos graxos ômega-3 EPA e DHA desempenham um importante papel na aprendizagem e memória, em todas as fases da vida, estando particularmente envolvidos na manutenção desses processos durante o envelhecimento (PARLETTA; MILTE; MEYER, 2013). Recentemente, relatou-se os efeitos da associação entre EPA/DHA e vitamina A no processamento mnemônico. Observou-se que a associação dos mesmos é capaz de melhorar memória espacial e atenuar a redução da expressão dos receptores retinóicos associados ao envelhecimento (LÉTONDOR et

al., 2016). Os resultados comportamentais obtidos no presente trabalho estão de acordo com esse estudo, uma vez que a associação dos três nutrientes foi capaz de reverter o prejuízo observado na consolidação da memória de medo condicionado ao contexto, induzido por um estresse do tipo social na adolescência, tanto nessa fase quanto na idade adulta

A maioria dos trabalhos existentes que abordam o tema estresse, relatam a participação do hipocampo na resposta do organismo ao estresse, bem como modificações a nível hipocampal após um estímulo estressor (ver revisão em BURKE et al., 2017). O hipocampo possui uma alta densidade de receptores de corticosteróides, estando, portanto, particularmente envolvido na regulação do eixo HPA. Além disso, o hipocampo continua a amadurecer na adolescência, por exemplo, a neurogênese e a densidade das espinhas dendríticas são maiores no início da adolescência, começando a declinar logo após a puberdade (HE; CREWS, 2007; YILDIRIM et al., 2008). Ainda, tanto a neurogênese quanto a arborização dendrítica no hipocampo são altamente sensíveis a fatores estressores na adolescência. (MCEWEN, 2012). Evidências demonstram que também os circuitos da memória de medo continuam a amadurecer até o final da adolescência, o que explica a plasticidade aumentada, também em resposta a um fator estressor, nessa fase da vida (MCCORMICK; MONGILLO; SIMONE, 2013).

Os resultados aqui apresentados estão de acordo com a literatura existente, a qual mostra que a exposição ao estresse diminui a expressão do BDNF e induz atrofia apical dendrítica, particularmente no hipocampo e córtex pré-frontal (ANDERO; CHOI; RESSLER, 2014; MURÍNOVÁ et al., 2017; ORTIZ; CONRAD, 2018). Até o momento, essas alterações só poderiam ser atenuadas pelo tratamento crônico com antidepressivos (DUMAN; MONTEGGIA, 2006; KOPONEN et al., 2005). Através do presente trabalho, demonstrou-se que o consumo de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3 também modulam, parcialmente, as alterações mencionadas, uma vez que a mesma previne a redução da expressão do BDNF no hipocampo.

CONCLUSÕES

O medo condicionado é uma importante forma de aprendizagem e de memória, pois através dele as espécies animais aprendem a identificar eventos ameaçadores e reagir adequadamente frente aos mesmos. Investigar os substratos neurais e as áreas cerebrais requeridas nos processos mnemônicos de consolidação, reconsolidação e extinção da memória de medo faz-se necessário não somente para a compreensão dos transtornos psiquiátricos que envolvem essa memória, mas também para o conhecimento do que acontece a nível cerebral quando a memória de medo é formada e/ou evocada.

Na presente tese de doutorado relatou-se as primeiras evidências do envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ da região CA1 do hipocampo dorsal nos processos de estabilização da memória de medo condicionado ao contexto. Interessantemente, observou-se ainda que tais receptores atuam de diferentes maneiras sobre a consolidação e a reconsolidação da memória de MCC, reforçando assim a teoria de que a reconsolidação não é uma simples repetição da consolidação.

Neste estudo, também demonstrou-se a participação das enzimas anidrases carbônicas no processo de extinção da memória de medo condicionado ao contexto. Esta participação se dá através da ação das CAs presentes em regiões cerebrais cruciais para a aprendizagem e a memória. Este é um importante achado pois reforça a presença das anidrases carbônicas nas regiões do hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal medial. Observou-se ainda um aumento na expressão de c-Fos na região do vmPFC dos animais que demonstraram um prejuízo na consolidação da memória de extinção de MCC.

Para finalizar, o presente trabalho mostrou que o estresse social na adolescência é capaz de prejudicar a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto nessa fase e também na idade adulta. Na busca por alternativas capazes de impedir esse prejuízo, observou-se que o mesmo pode ser prevenido em ambos os períodos da vida através do consumo de uma dieta rica em vitamina A e ômega-3. Demonstrou-se ainda uma redução na expressão do BDNF hipocampal dos animais adolescentes e adultos submetidos ao estresse de instabilidade social com a dieta controle, após a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto. A redução observada na expressão deste importante fator neurotrófico também foi prevenida pela dieta enriquecida com vitamina A e ômega-3.

Em conjunto, os resultados aqui descritos possibilitam ampliar a compreensão acerca dos mecanismos moleculares subjacentes aos processos de consolidação, reconsolidação e extinção da memória de medo condicionado ao contexto, servindo como base para pesquisas

futuras cuja finalidade seja o tratamento de condições clínicas nas quais o processamento da memória de medo está alterado.

REFERÊNCIAS

- ABEL, T.; KANDEL, E. Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. **Brain Research. Brain Research Reviews**, v. 26, n. 2–3, p. 360–378, maio 1998.
- AGGLETON, J. P.; BROWN, M. W.; ALBASSER, M. M. Contrasting brain activity patterns for item recognition memory and associative recognition memory: insights from immediate-early gene functional imaging. **Neuropsychologia**, v. 50, n. 13, p. 3141–3155, nov. 2012.
- AGREN, T. et al. Human fear reconsolidation and allelic differences in serotonergic and dopaminergic genes. **Translational Psychiatry**, v. 2, p. e76, 2012.
- AL TANOURY, Z.; PISKUNOV, A.; ROCHETTE-EGLY, C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 7, p. 1761–1775, jul. 2013.
- ALBASSER, M. M.; POIRIER, G. L.; AGGLETON, J. P. Qualitatively different modes of perirhinal-hippocampal engagement when rats explore novel vs. familiar objects as revealed by c-Fos imaging. **The European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 134–147, jan. 2010.
- ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? **Trends Neurosci**, v. 28, p. 51–6, jan. 2005.
- ALBERINI, C. M.; KANDEL, E. R. The regulation of transcription in memory consolidation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 1, p. a021741, jan. 2015.
- ALBERINI, C. M.; LEDOUX, J. E. Memory reconsolidation. **Current Biology**, v. 23, n. 17, p. R746–R750, set. 2013.
- ALBERINI, C. M.; MILEKIC, M. H.; TRONEL, S. Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 63, n. 9, p. 999–1008, maio 2006.
- ALBRIGHT, T. D.; KANDEL, E. R.; POSNER, M. I. Cognitive neuroscience. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, n. 5, p. 612–624, out. 2000.
- ALESSANDRI, J.-M. et al. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 44, n. 6, p. 509–538, dez. 2004.
- AMBROGI LORENZINI, C. G. et al. Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. **Neurobiol Learn Mem**, v. 71, p. 1–18, jan. 1999.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Fifth Edition ed. [s.l.] American Psychiatric Association, 2013.
- ANAGNOSTARAS, S. G.; GALE, G. D.; FANSELOW, M. S. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. **Hippocampus**, v. 11, n. 1, p. 8–17, 2001.

ANDERO, R.; CHOI, D. C.; RESSLER, K. J. BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 122, p. 169–192, 2014.

ANDERSEN, S. L.; TEICHER, M. H. Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. **Trends in Neurosciences**, v. 31, n. 4, p. 183–191, abr. 2008.

ANDRADE, R.; HAJ-DAHMANE, S. Serotonin neuron diversity in the dorsal raphe. **ACS chemical neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 22–25, 16 jan. 2013.

ARULSAMY, A. et al. Evaluation of early chronic functional outcomes and their relationship to pre-frontal cortex and hippocampal pathology following moderate-severe traumatic brain injury. **Behavioural Brain Research**, v. 348, p. 127–138, 01 2018.

BADDELEY, A. Working memory. **Science (New York, N.Y.)**, v. 255, n. 5044, p. 556–559, 31 jan. 1992.

BADDELEY, A.; ANDERSON, M. C.; EYSENCK, M. W. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

BAILEY, C. H.; BARTSCH, D.; KANDEL, E. R. Toward a molecular definition of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 13445–13452, 26 nov. 1996.

BALDERAS, I. et al. The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 15, n. 9, p. 618–624, set. 2008.

BALDI, E.; BUCHERELLI, C. Substantia nigra, nucleus basalis magnocellularis and basolateral amygdala roles in extinction of contextual fear conditioning in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 2, p. 199–205, set. 2010.

BALDI, E.; BUCHERELLI, C. Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 53, p. 160–190, jun. 2015.

BALDI, E.; MARIOTTINI, C.; BUCHERELLI, C. Substantia nigra role in fear conditioning consolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, n. 1, p. 133–139, jan. 2007.

BARBOSA, F. F. et al. Differential Cortical c-Fos and Zif-268 Expression after Object and Spatial Memory Processing in a Standard or Episodic-Like Object Recognition Task. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, p. 112, 2013.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 8, p. 1083–1152, ago. 1999.

BAUER, E. P. Serotonin in fear conditioning processes. **Behavioural Brain Research**, v. 277, p. 68–77, jan. 2015.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica (4a. ed.)**. Rio de Janeiro: Elsevier Health Sciences Brazil - T, 2015.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências desvendando o sistema nervoso**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

BECKETT, W. S. Post-traumatic stress disorder. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 19, p. 1495–1498; author reply 1495-1498, 9 maio 2002.

BELTZ, B. S. et al. Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis. **Neuroscience Letters**, v. 415, n. 2, p. 154–158, 26 mar. 2007.

BENETTI, F. et al. Histamine in the basolateral amygdala promotes inhibitory avoidance learning independently of hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 19, p. E2536-2542, 12 maio 2015.

BERGER, M.; GRAY, J. A.; ROTH, B. L. The expanded biology of serotonin. **Annual Review of Medicine**, v. 60, p. 355–366, 2009.

BIEDENKAPP, J. C.; RUDY, J. W. Hippocampal and extrahippocampal systems compete for control of contextual fear: role of ventral subiculum and amygdala. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 16, n. 1, p. 38–45, jan. 2009.

BIGOS, K. L. et al. Acute 5-HT reuptake blockade potentiates human amygdala reactivity. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 13, p. 3221–3225, dez. 2008.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 13 Suppl, p. S3-14, 1989.

BLANCHARD, R. J.; MCKITTRICK, C. R.; BLANCHARD, D. C. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. **Physiology & Behavior**, v. 73, n. 3, p. 261–271, jun. 2001.

BOCCHIO, M. et al. Serotonin, Amygdala and Fear: Assembling the Puzzle. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 10, p. 24, 2016a.

BOCCHIO, M. et al. Serotonin, Amygdala and Fear: Assembling the Puzzle. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 10, p. 24, 2016b.

BODNAR, L. M.; WISNER, K. L. Nutrition and Depression: Implications for Improving Mental Health Among Childbearing-Aged Women. **Biological Psychiatry**, v. 58, n. 9, p. 679–685, nov. 2005.

BONAVENTURE, P. et al. Pharmacological blockade of serotonin 5-HT₇ receptor reverses working memory deficits in rats by normalizing cortical glutamate neurotransmission. **PLoS one**, v. 6, n. 6, 2011.

BONHOMME, D. et al. Retinoic acid modulates intrahippocampal levels of corticosterone in middle-aged mice: consequences on hippocampal plasticity and contextual memory. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, p. 6, 2014.

BOZZATELLO, P. et al. Supplementation with Omega-3 Fatty Acids in Psychiatric Disorders: A Review of Literature Data. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n. 8, 27 jul. 2016.

- BRAMHAM, C. R.; MESSAOUDI, E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. **Progress in Neurobiology**, v. 76, n. 2, p. 99–125, jun. 2005.
- BRANCHEK, T. A.; BLACKBURN, T. P. 5-HT₆ receptors as emerging targets for drug discovery. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 40, p. 319–334, 2000.
- BRAVO-RIVERA, C. et al. Persistent active avoidance correlates with activity in prelimbic cortex and ventral striatum. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, p. 184, 2015.
- BUCCAFUSCO, J. J. (ED.). **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. 2nd. ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2009.
- BURGOS-ROBLES, A. et al. Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. **Neuron**, v. 53, n. 6, p. 871–880, 15 mar. 2007.
- BURIANOVA, H.; MCINTOSH, A. R.; GRADY, C. L. A common functional brain network for autobiographical, episodic, and semantic memory retrieval. **NeuroImage**, v. 49, n. 1, p. 865–874, 1 jan. 2010.
- BURKE, A. R. et al. Impact of adolescent social experiences on behavior and neural circuits implicated in mental illnesses. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 76, n. Pt B, p. 280–300, 2017.
- BUWALDA, B. et al. Social behavior and social stress in adolescence: a focus on animal models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 8, p. 1713–1721, ago. 2011.
- CAHILL, L.; MCGAUGH, J. L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in Neurosciences**, v. 21, n. 7, p. 294–299, jul. 1998.
- CAMMER, W.; TANSEY, F. A. The astrocyte as a locus of carbonic anhydrase in the brains of normal and dysmyelinating mutant mice. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 275, n. 1, p. 65–75, 1 set. 1988.
- CANTO DE SOUZA, L. et al. Carbonic anhydrase activation enhances object recognition memory in mice through phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase in the cortex and the hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 118, p. 148–156, 15 maio 2017.
- CAVALLARO, S. Genomic analysis of serotonin receptors in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, v. 195, n. 1, p. 2–6, 16 dez. 2008.
- CELADA, P.; PUIG, M. V.; ARTIGAS, F. Serotonin modulation of cortical neurons and networks. **Frontiers in integrative neuroscience**, v. 7, 2013.
- CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA**, v. 267, n. 9, p. 1244–1252, 4 mar. 1992.
- CIFARIELLO, A.; POMPILI, A.; GASBARRI, A. 5-HT₇ receptors in the modulation of cognitive processes. **Behavioural brain research**, v. 195, n. 1, p. 171–179, 16 dez. 2008.
- CIOCCHI, S. et al. Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 277–282, 11 nov. 2010.

- CONWAY, M. A. Episodic memories. **Neuropsychologia**, v. 47, n. 11, p. 2305–2313, set. 2009.
- DA SILVA, W. C. et al. Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Hippocampus**, v. 18, n. 1, p. 29–39, 2008.
- DASKALAKIS, N. P. et al. Early Life Stress Effects on Glucocorticoid-BDNF Interplay in the Hippocampus. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, p. 68, 2015.
- DAVIS, H. P.; SQUIRE, L. R. Protein synthesis and memory: a review. **Psychological Bulletin**, v. 96, n. 3, p. 518–559, nov. 1984.
- DAVIS, M. Role of NMDA receptors and MAP kinase in the amygdala in extinction of fear: clinical implications for exposure therapy. **The European Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 395–398, ago. 2002.
- DAVIS, M. et al. Effects of D-cycloserine on extinction: translation from preclinical to clinical work. **Biological psychiatry**, v. 60, n. 4, p. 369–375, 15 ago. 2006.
- DE CARVALHO MYSKIW, J. et al. Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 12, p. 4572–4577, 25 mar. 2014.
- DE CARVALHO MYSKIW, J. et al. Extinction learning, which consists of the inhibition of retrieval, can be learned without retrieval. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 2, p. E230–E233, 13 jan. 2015.
- DE CARVALHO MYSKIW, J.; BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Behavioral tagging of extinction learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 3, p. 1071–1076, 15 jan. 2013a.
- DE CARVALHO MYSKIW, J.; BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Behavioral tagging of extinction learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 3, p. 1071–1076, 15 jan. 2013b.
- DE VRIES, G. J.; BUIJS, R. M.; SWAAB, D. F. Ontogeny of the vasopressinergic neurons of the suprachiasmatic nucleus and their extrahypothalamic projections in the rat brain--presence of a sex difference in the lateral septum. **Brain Research**, v. 218, n. 1–2, p. 67–78, 10 ago. 1981.
- DEBIEC, J.; LEDOUX, J. E.; NADER, K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. **Neuron**, v. 36, n. 3, p. 527–538, 24 out. 2002.
- DELL'OSSO, L. et al. Brain-derived neurotrophic factor plasma levels in patients suffering from post-traumatic stress disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, n. 5, p. 899–902, 1 ago. 2009.
- DER-AVAKIAN, A.; MARKOU, A. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 1, p. 68–77, jan. 2012.

D'ESPOSITO, M. et al. The neural basis of the central executive system of working memory. **Nature**, v. 378, n. 6554, p. 279–281, 16 nov. 1995.

DRÄGER, U. C. Retinoic acid signaling in the functioning brain. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, v. 2006, n. 324, p. pe10, 28 fev. 2006.

DUDAI, Y. Consolidation: fragility on the road to the engram. **Neuron**, v. 17, n. 3, p. 367–370, set. 1996.

DUDAI, Y. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, n. 2, p. 211–216, abr. 2002.

DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annual review of psychology**, v. 55, p. 51–86, 2004.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116–1127, 15 jun. 2006.

DYALL, S. C. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 7, p. 52, 2015.

DYALL, S. C.; MICHAEL, G. J.; MICHAEL-TITUS, A. T. Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptors and increase neurogenesis in old rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 10, p. 2091–2102, 1 ago. 2010.

DYALL, S. C.; MICHAEL-TITUS, A. T. Neurological benefits of omega-3 fatty acids. **Neuromolecular Medicine**, v. 10, n. 4, p. 219–235, 2008.

EGAN, M. F. et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. **Cell**, v. 112, n. 2, p. 257–269, 24 jan. 2003.

EHRlich, I. et al. Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. **Neuron**, v. 62, n. 6, p. 757–771, 25 jun. 2009.

EILAM, D. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. **Behavioural Brain Research**, v. 142, n. 1–2, p. 53–62, 16 jun. 2003.

ERIKSSON, T. M. et al. 5-HT₇ receptor stimulation by 8-OH-DPAT counteracts the impairing effect of 5-HT_{1A} receptor stimulation on contextual learning in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 596, n. 1–3, p. 107–110, 31 out. 2008.

ERIKSSON, T. M. et al. 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptor crosstalk in the regulation of emotional memory: implications for effects of selective serotonin reuptake inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 6, p. 1150–1160, nov. 2012.

ETCHAMENDY, N. et al. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 16, p. 6423–6429, 15 ago. 2001.

EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; MCNAUGHTON, B. L. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. **Neuron**, v. 76, n. 6, p. 1057–1070, 20 dez. 2012.

FABBRI, R. et al. Memory retrieval of inhibitory avoidance requires histamine H1 receptor activation in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 19, p. E2714-2720, 10 maio 2016.

FIORENZA, N. G. et al. Treatment of fear memories: interactions between extinction and reconsolidation. **Anais Da Academia Brasileira De Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1363–1372, dez. 2011.

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.

FISCHER, A. et al. Hippocampal Mek/Erk signaling mediates extinction of contextual freezing behavior. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, n. 1, p. 149–158, jan. 2007.

FLEXNER, L. B.; FLEXNER, J. B.; STELLAR, E. Memory and cerebral protein synthesis in mice as affected by graded amounts of puromycin. **Experimental Neurology**, v. 13, n. 3, p. 264–272, nov. 1965.

FUCHS, E. et al. Psychosocial stress, glucocorticoids, and structural alterations in the tree shrew hippocampus. **Physiology & Behavior**, v. 73, n. 3, p. 285–291, jun. 2001.

FURINI, C. R. G. et al. The relationship between protein synthesis and protein degradation in object recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 294, p. 17–24, 1 nov. 2015.

GALLO, F. T. et al. Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, p. 79, 2018.

GASBARRI, A. et al. Effect of 5-HT(7) antagonist SB-269970 in the modulation of working and reference memory in the rat. **Behavioural brain research**, v. 195, n. 1, p. 164–170, 16 dez. 2008.

GHANDOUR, M. S. et al. Immunochemical and immunohistochemical study of carbonic anhydrase II in adult rat cerebellum: a marker for oligodendrocytes. **Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 559–571, 1980.

GHANDOUR, M. S. et al. Carbonic anhydrase IV on brain capillary endothelial cells: a marker associated with the blood-brain barrier. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 15, p. 6823–6827, 1 ago. 1992.

GHANDOUR, M. S. et al. Mitochondrial carbonic anhydrase in the nervous system: expression in neuronal and glial cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 5, p. 2212–2220, nov. 2000.

GIESE, K. P.; MIZUNO, K. The roles of protein kinases in learning and memory. **Learn Mem**, v. 20, p. 540–52, out. 2013.

GILMOUR, K. M. Perspectives on carbonic anhydrase. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 157, n. 3, p. 193–197, nov. 2010.

GLICKMAN, S. E. Perseverative neural processes and consolidation of the memory trace. **Psychological Bulletin**, v. 58, p. 218–233, maio 1961.

GODLEWSKA, B. R. et al. Short-term SSRI treatment normalises amygdala hyperactivity in depressed patients. **Psychological Medicine**, v. 42, n. 12, p. 2609–2617, dez. 2012.

GOELET, P. et al. The long and the short of long-term memory--a molecular framework. **Nature**, v. 322, n. 6078, p. 419–422, 31 ago. 1986.

GOÑI-BALENTZIAGA, O. et al. Social instability in female rodents as a model of stress related disorders: A systematic review. **Physiology & Behavior**, v. 196, p. 190–199, 6 set. 2018.

GONZALEZ, R.; CHÁVEZ-PASCACIO, K.; MENESES, A. Role of 5-HT_{5A} receptors in the consolidation of memory. **Behavioural Brain Research**, v. 252, p. 246–251, 1 set. 2013.

GOOSENS, K. A.; SAPOLSKY, R. M. Stress and Glucocorticoid Contributions to Normal and Pathological Aging. In: RIDDLE, D. R. (Ed.). . **Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms**. Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2007.

GORDON, N. S. et al. Expression of c- fos gene activation during rough and tumble play in juvenile rats. **Brain Research Bulletin**, v. 57, n. 5, p. 651–659, mar. 2002.

GORDON, N. S. et al. Socially-induced brain ‘fertilization’: play promotes brain derived neurotrophic factor transcription in the amygdala and dorsolateral frontal cortex in juvenile rats. **Neuroscience Letters**, v. 341, n. 1, p. 17–20, abr. 2003.

GORMAN, J. M. Treating generalized anxiety disorder. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 64 Suppl 2, p. 24–29, 2003.

GRATACÒS, M. et al. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders, and schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 61, n. 7, p. 911–922, 1 abr. 2007.

GRAVIUS, A. et al. Effects of 5-HT₆ antagonists, Ro-4368554 and SB-258585, in tests used for the detection of cognitive enhancement and antipsychotic-like activity. **Behavioural pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 122–135, abr. 2011.

GRAYBEAL, C.; KISELYCZNYK, C.; HOLMES, A. Stress-induced deficits in cognition and emotionality: a role of glutamate. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 12, p. 189–207, 2012.

GREENOUGH WT. Morphological and molecular studies of synaptic memory mechanisms: links to the fragile X mental retardation syndrome. In: **Memory Consolidation: Essays in Honor of James L. McGaugh**. Washington DC: Gold PE, Greenough WT, 2000.

GUTMAN, D. A.; NEMEROFF, C. B. Persistent central nervous system effects of an adverse early environment: clinical and preclinical studies. **Physiology & Behavior**, v. 79, n. 3, p. 471–478, ago. 2003.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385–403, 1934.

HAUCK, S. et al. Serum brain-derived neurotrophic factor in patients with trauma psychopathology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, n. 3, p. 459–462, 16 abr. 2010.

HE, J.; CREWS, F. T. Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 86, n. 2, p. 327–333, fev. 2007.

HEBB. Hebb, D. O. The organization of behavior: A neuropsychological theory. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1949. 335 p. \$4.00. **Science Education**, v. 34, n. 5, p. 336–337, dez. 1950.

HIBBELN, J. R.; SALEM, N. Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: when cholesterol does not satisfy. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 1, p. 1–9, 1 jul. 1995.

HODGES, T. E.; BAUMBACH, J. L.; MCCORMICK, C. M. Predictors of social instability stress effects on social interaction and anxiety in adolescent male rats. **Developmental Psychobiology**, v. 60, n. 6, p. 651–663, set. 2018.

HOMBERG, J. R. Serotonergic modulation of conditioned fear. **Scientifica**, v. 2012, p. 821549, 2012.

HUHMANN, K. L. Social conflict models: can they inform us about human psychopathology? **Hormones and Behavior**, v. 50, n. 4, p. 640–646, nov. 2006.

HYMAN, J. M. et al. Contextual encoding by ensembles of medial prefrontal cortex neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 13, p. 5086–5091, 27 mar. 2012.

ILIES, M. et al. Carbonic anhydrase activators: design of high affinity isozymes I, II, and IV activators, incorporating tri-/tetrasubstituted-pyridinium-azole moieties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 504–510, 17 jan. 2002.

IMTAIYAZ HASSAN, M. et al. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1570–1582, 15 mar. 2013.

IZQUIERDO, I. et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635–636, 18 jun. 1998.

IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 1–11, ago. 1999.

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

IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C. Fear Memory. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 2, p. 695–750, abr. 2016.

JOFFRE, C. et al. n-3 LCPUFA improves cognition: the young, the old and the sick. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 91, n. 1–2, p. 1–20, ago. 2014.

JOHNSON, E. O. et al. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 16, n. 2, p. 115–130, 1992.

JUDGE, M. E.; QUARTERMAIN, D. Characteristics of retrograde amnesia following reactivation of memory in mice. **Physiology & Behavior**, v. 28, n. 4, p. 585–590, abr. 1982.

KACZMAREK, L. Molecular biology of vertebrate learning: is c-fos a new beginning? **Journal of Neuroscience Research**, v. 34, n. 4, p. 377–381, 1 mar. 1993.

KACZMAREK, L. Gene expression in learning processes. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 60, n. 3, p. 419–424, 2000.

KAILA, K. et al. Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K⁺ transient. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 20, p. 7662–7672, 15 out. 1997.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5544, p. 1030–1038, 2 nov. 2001.

KASSAI, F. et al. Effect of 5-HT_{2A} antagonists in animal models of schizophrenia, anxiety and depression. **Behavioural Pharmacology**, v. 23, n. 4, p. 397–406, ago. 2012.

KATCHE, C. et al. Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 1, p. 349–354, 5 jan. 2010.

KATCHE, C.; MEDINA, J. H. Requirement of an Early Activation of BDNF/c-Fos Cascade in the Retrosplenial Cortex for the Persistence of a Long-Lasting Aversive Memory. **Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)**, v. 27, n. 2, p. 1060–1067, 01 2017.

KATZUNG, B. G.; VOEUX, P. L.; SILVA, P. **Farmacologia: básica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006.

KAUR, I. P. et al. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 248, n. 1–2, p. 1–14, 6 nov. 2002.

KELLER, S. et al. Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, n. 3, p. 258–267, mar. 2010.

KHEIRBEK, M. A. et al. Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. **Neuron**, v. 77, n. 5, p. 955–968, 6 mar. 2013.

KIM, E. J.; PELLMAN, B.; KIM, J. J. Stress effects on the hippocampus: a critical review. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 22, n. 9, p. 411–416, set. 2015.

KIMELBERG, H. K.; STIEG, P. E.; MAZURKIEWICZ, J. E. Immunocytochemical and biochemical analysis of carbonic anhydrase in primary astrocyte cultures from rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 39, n. 3, p. 734–742, set. 1982.

KING, M. V. et al. 5-HT₆ receptor antagonists reverse delay-dependent deficits in novel object discrimination by enhancing consolidation--an effect sensitive to NMDA receptor antagonism. **Neuropharmacology**, v. 47, n. 2, p. 195–204, ago. 2004.

KING, M. V.; MARSDEN, C. A.; FONE, K. C. F. A role for the 5-HT_{1A}, 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors in learning and memory. **Trends in pharmacological sciences**, v. 29, n. 9, p. 482–492, set. 2008.

KOLB, B.; WHISHAW, I. Q. **Neurociência do comportamento**. Barueri: Manole, 2002.

KOMPUS, K. et al. Dynamic switching between semantic and episodic memory systems. **Neuropsychologia**, v. 47, n. 11, p. 2252–2260, set. 2009.

KOOLHAAS, J. M. et al. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 5, p. 1291–1301, abr. 2011.

KOPONEN, E. et al. Enhanced BDNF signaling is associated with an antidepressant-like behavioral response and changes in brain monoamines. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 25, n. 6, p. 973–980, set. 2005.

KUDIELKA, B. M.; WÜST, S. Human models in acute and chronic stress: assessing determinants of individual hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity and reactivity. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 13, n. 1, p. 1–14, jan. 2010.

KUMPULAINEN, T.; KORHONEN, L. K. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzyme C in the central and peripheral nervous system of the mouse. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 30, n. 4, p. 283–292, abr. 1982.

LABROUSSE, V. F. et al. Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. e36861, 2012.

LAMBERT, C. et al. Anhedonia in depression and schizophrenia: A transdiagnostic challenge. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 24, n. 7, p. 615–623, jul. 2018.

LANE, M. A.; BAILEY, S. J. Role of retinoid signalling in the adult brain. **Progress in Neurobiology**, v. 75, n. 4, p. 275–293, mar. 2005.

LAURENT, V.; WESTBROOK, R. F. Distinct contributions of the basolateral amygdala and the medial prefrontal cortex to learning and relearning extinction of context conditioned fear. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 15, n. 9, p. 657–666, set. 2008.

LEAL, G.; COMPRIDO, D.; DUARTE, C. B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. **Neuropharmacology**, v. 76 Pt C, p. 639–656, jan. 2014.

LEDOUX, J. The emotional brain, fear, and the amygdala. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, n. 4–5, p. 727–738, out. 2003.

LEDOUX, J. E. Coming to terms with fear. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 8, p. 2871–2878, 25 fev. 2014.

- LEE, J. L. C. Reconsolidation: maintaining memory relevance. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 8, p. 413–420, ago. 2009.
- LEE, J. L.; EVERITT, B. J.; THOMAS, K. L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science**, v. 304, p. 839–43, maio 2004.
- LEES, G. V.; JONES, E. G.; KANDEL, E. Expressive genes record memories. **Neurobiology of Disease**, v. 7, n. 5, p. 533–536, out. 2000.
- LEOPOLDO, M. Serotonin(7) receptors (5-HT(7)Rs) and their ligands. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 629–661, mar. 2004.
- LEOPOLDO, M. et al. Serotonin 5-HT7 receptor agents: Structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. **Pharmacology & therapeutics**, v. 129, n. 2, p. 120–148, fev. 2011.
- LÉTONDOR, A. et al. EPA/DHA and Vitamin A Supplementation Improves Spatial Memory and Alleviates the Age-related Decrease in Hippocampal RXR γ and Kinase Expression in Rats. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, p. 103, 2016.
- LEWIS, D. J. Psychobiology of active and inactive memory. **Psychological Bulletin**, v. 86, n. 5, p. 1054–1083, set. 1979.
- LIEBEN, C. K. J. et al. Acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture impairs object memory but not affective behavior and spatial learning in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 151, n. 1–2, p. 53–64, 5 maio 2004.
- LINDNER, M. D. et al. An assessment of the effects of serotonin 6 (5-HT6) receptor antagonists in rodent models of learning. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 307, n. 2, p. 682–691, nov. 2003.
- LINDSKOG, S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 74, n. 1, p. 1–20, 1997.
- LINDSKOG, S.; SILVERMAN, D. N. The catalytic mechanism of mammalian carbonic anhydrases. **EXS**, n. 90, p. 175–195, 2000.
- LIY-SALMERON, G.; MENESES, A. Role of 5-HT1-7 receptors in short- and long-term memory for an autoshaping task: intrahippocampal manipulations. **Brain research**, v. 1147, p. 140–147, 25 maio 2007.
- LOISEAU, F.; DEKEYNE, A.; MILLAN, M. J. Pro-cognitive effects of 5-HT6 receptor antagonists in the social recognition procedure in rats: implication of the frontal cortex. **Psychopharmacology**, v. 196, n. 1, p. 93–104, jan. 2008.
- LU, Y.; CHRISTIAN, K.; LU, B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, n. 3, p. 312–323, mar. 2008.
- MA, H.; LI, B.; TSIEN, R. W. Distinct roles of multiple isoforms of CaMKII in signaling to the nucleus. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1853, n. 9, p. 1953–1957, set. 2015.

MACTUTUS, C. F.; RICCIO, D. C.; FERREK, J. M. Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 204, n. 4399, p. 1319–1320, 22 jun. 1979.

MADEN, M.; GALE, E.; ZILE, M. The role of vitamin A in the development of the central nervous system. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 2 Suppl, p. 471S-475S, 1998.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 897–931, 2001.

MAREN, S.; PHAN, K. L.; LIBERZON, I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 417–428, jun. 2013.

MASIÁ, S. et al. Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 21, n. 10, p. 2391–2402, out. 2007.

MATHIEU, G. et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation together with early maternal separation increases anxiety and vulnerability to stress in adult rats. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 85, n. 3–4, p. 129–136, out. 2011.

MAYFORD, M.; KANDEL, E. R. Genetic approaches to memory storage. **Trends in genetics: TIG**, v. 15, n. 11, p. 463–470, nov. 1999.

MAYFORD, M.; SIEGELBAUM, S. A.; KANDEL, E. R. Synapses and memory storage. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 6, jun. 2012.

MCCAFFERY, P.; ZHANG, J.; CRANDALL, J. E. Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus. **Journal of Neurobiology**, v. 66, n. 7, p. 780–791, jun. 2006.

MCCORMICK, C. M. et al. Social instability stress in adolescent male rats alters hippocampal neurogenesis and produces deficits in spatial location memory in adulthood. **Hippocampus**, v. 22, n. 6, p. 1300–1312, jun. 2012.

MCCORMICK, C. M.; MONGILLO, D. L.; SIMONE, J. J. Age and adolescent social stress effects on fear extinction in female rats. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 16, n. 6, p. 678–688, nov. 2013.

MCEWEN, B. S. The ever-changing brain: Cellular and molecular mechanisms for the effects of stressful experiences. **Developmental Neurobiology**, v. 72, n. 6, p. 878–890, jun. 2012.

MCGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. **Science (New York, N.Y.)**, v. 153, n. 3742, p. 1351–1358, 16 set. 1966.

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science**, v. 287, p. 248–51, jan. 2000.

MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual review of neuroscience**, v. 27, p. 1–28, 2004.

MCGAUGH, J. L. Making lasting memories: remembering the significant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110 Suppl 2, p. 10402–10407, 18 jun. 2013.

MCGREGOR, I. S. et al. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 17, p. 4134–4144, 28 abr. 2004.

MCNAMARA, R. K.; CARLSON, S. E. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 75, n. 4–5, p. 329–349, nov. 2006.

MEIER-RUGE, W. et al. Neurochemical findings in the aging brain. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**, v. 23, p. 323–338, 1980.

MEIER-RUGE, W.; IWANGOFF, P.; REICHLMEIER, K. Neurochemical enzyme changes in Alzheimer's and Pick's disease. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 3, n. 2, p. 161–165, jul. 1984.

MELDRUM, N. U.; ROUGHTON, F. J. Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. **The Journal of Physiology**, v. 80, n. 2, p. 113–142, 5 dez. 1933.

MÉNARD, C.; GAUDREAU, P.; QUIRION, R. Signaling pathways relevant to cognition-enhancing drug targets. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 228, p. 59–98, 2015.

MENESES, A. Effects of the 5-HT7 receptor antagonists SB-269970 and DR 4004 in autoshaping Pavlovian/instrumental learning task. **Behavioural brain research**, v. 155, n. 2, p. 275–282, 6 dez. 2004.

MENESES, A. Stimulation of 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A/2C, 5-HT3 and 5-HT4 receptors or 5-HT uptake inhibition: short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 184, n. 1, p. 81–90, 22 nov. 2007.

MENESES, A. 5-HT systems: emergent targets for memory formation and memory alterations. **Reviews in the Neurosciences**, v. 24, n. 6, p. 629–664, 2013.

MENESES, A. Memory formation and memory alterations: 5-HT6 and 5-HT7 receptors, novel alternative. **Reviews in the Neurosciences**, v. 25, n. 3, p. 325–356, 2014.

MENESES, A. Serotonin, neural markers, and memory. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 143, 2015.

MENESES, A.; GASBARRI, B. Editorial: Serotonin and Memory. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 8, 2016.

MEY, J.; MCCAFFERY, P. Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates. **The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry**, v. 10, n. 5, p. 409–421, out. 2004.

MILEKIC, M. H.; ALBERINI, C. M. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. **Neuron**, v. 36, n. 3, p. 521–525, 24 out. 2002.

MINGAUD, F. et al. Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 279–291, 2 jan. 2008.

MISANE, I.; OGREN, S. O. Multiple 5-HT receptors in passive avoidance: comparative studies of p-chloroamphetamine and 8-OH-DPAT. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 168–190, fev. 2000.

MISANIN, J. R.; MILLER, R. R.; LEWIS, D. J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. **Science (New York, N.Y.)**, v. 160, n. 3827, p. 554–555, 3 maio 1968.

MITCHELL, E. S.; NEUMAIER, J. F. 5-HT₆ receptors: a novel target for cognitive enhancement. **Pharmacology & therapeutics**, v. 108, n. 3, p. 320–333, dez. 2005.

MORRISSEY, M. D.; MATHEWS, I. Z.; MCCORMICK, C. M. Enduring deficits in contextual and auditory fear conditioning after adolescent, not adult, social instability stress in male rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 95, n. 1, p. 46–56, jan. 2011.

MURÍNOVÁ, J. et al. The Evidence for Altered BDNF Expression in the Brain of Rats Reared or Housed in Social Isolation: A Systematic Review. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, p. 101, 2017.

MURPHY, S. E. et al. Effect of a single dose of citalopram on amygdala response to emotional faces. **The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science**, v. 194, n. 6, p. 535–540, jun. 2009.

MYERS, K. M.; DAVIS, M. Mechanisms of fear extinction. **Molecular psychiatry**, v. 12, n. 2, p. 120–150, fev. 2007.

MYSKIW, J. C. et al. On the participation of mTOR in recognition memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 89, p. 338–51, mar. 2008.

NADER, K. Reconsolidation and the Dynamic Nature of Memory. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 10, p. a021782, out. 2015.

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

NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 722–726, 17 ago. 2000.

NESTLER, E. J.; KELZ, M. B.; CHEN, J. DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. **Brain Research**, v. 835, n. 1, p. 10–17, 17 jul. 1999.

NICIU, M. J. et al. Glutamate receptor antagonists as fast-acting therapeutic alternatives for the treatment of depression: ketamine and other compounds. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 54, p. 119–139, 2014.

NISHIMORI, I. et al. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of the transmembrane isozyme XIV with sulfonamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 17, p. 3828–3833, set. 2005.

NOGUCHI, H. et al. Limited effect of omega-3 fatty acids on the quality of life in survivors of traumatic injury: A randomized, placebo-controlled trial. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 127, p. 1–5, dez. 2017.

NORDQUIST, N.; ORELAND, L. Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders--a review. **Upsala journal of medical sciences**, v. 115, n. 1, p. 2–10, fev. 2010.

NUNFAM, V. F. et al. Social impacts of occupational heat stress and adaptation strategies of workers: A narrative synthesis of the literature. **The Science of the Total Environment**, v. 643, p. 1542–1552, 1 dez. 2018.

O'DONNELL, C.; SEJNOWSKI, T. J. Selective memory generalization by spatial patterning of protein synthesis. **Neuron**, v. 82, n. 2, p. 398–412, 16 abr. 2014.

OHMURA, Y. et al. Serotonin 5-HT₇ Receptor in the Ventral Hippocampus Modulates the Retrieval of Fear Memory and Stress-Induced Defecation. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 6, 01 2016.

OKUBO, R. et al. Mechanisms underlying the effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on fear memory processing and their hypothetical effects on fear of cancer recurrence in cancer survivors. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 131, p. 14–23, abr. 2018.

OLSON, C. R.; MELLO, C. V. Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 4, p. 489–495, abr. 2010.

ORTIZ, J. B.; CONRAD, C. D. The impact from the aftermath of chronic stress on hippocampal structure and function: Is there a recovery? **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 49, p. 114–123, abr. 2018.

PAPPATÀ, S.; SALVATORE, E.; POSTIGLIONE, A. In vivo imaging of neurotransmission and brain receptors in dementia. **Journal of Neuroimaging: Official Journal of the American Society of Neuroimaging**, v. 18, n. 2, p. 111–124, abr. 2008.

PARKKILA, S. et al. Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 4, p. 1918–1923, 13 fev. 2001.

PARLETTA, N.; MILTE, C. M.; MEYER, B. J. Nutritional modulation of cognitive function and mental health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 5, p. 725–743, maio 2013.

PAVLOV, I. **Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex**. London: Oxford University Press, 1927.

PAXINOS, G. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2nd ed ed. Sydney; Orlando: Academic Press, 1986.

PÉREZ-GARCÍA, G.; GONZALEZ-ESPINOSA, C.; MENESES, A. An mRNA expression analysis of stimulation and blockade of 5-HT₇ receptors during memory consolidation. **Behavioural brain research**, v. 169, n. 1, p. 83–92, 25 abr. 2006.

PEREZ-GARCIA, G.; MENESES, A. Memory time-course: mRNA 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 202, n. 1, p. 102–113, 24 ago. 2009.

PEREZ-GARCÍA, G. S.; MENESES, A. Effects of the potential 5-HT₇ receptor agonist AS 19 in an autoshaping learning task. **Behavioural brain research**, v. 163, n. 1, p. 136–140, 30 ago. 2005.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, n. 2, p. 274–285, abr. 1992.

PINAUD, R. Experience-dependent immediate early gene expression in the adult central nervous system: evidence from enriched-environment studies. **The International Journal of Neuroscience**, v. 114, n. 3, p. 321–333, mar. 2004.

PITMAN, R. K. et al. Biological studies of post-traumatic stress disorder. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 13, n. 11, p. 769–787, nov. 2012.

PIZZORUSSO, T. Neuroscience. Erasing fear memories. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5945, p. 1214–1215, 4 set. 2009.

POLDRACK, R. A.; PACKARD, M. G. Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. **Neuropsychologia**, v. 41, n. 3, p. 245–251, 2003.

PROVENSI, G. et al. Satiety factor oleoylethanolamide recruits the brain histaminergic system to inhibit food intake. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 31, p. 11527–11532, 5 ago. 2014.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 28 fev. 2003.

PRZYBYSLAWSKI, J.; SARA, S. J. Reconsolidation of memory after its reactivation. **Behavioural Brain Research**, v. 84, n. 1–2, p. 241–246, mar. 1997.

PYTLIAK, M. et al. Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 60, n. 1, p. 15–25, 2011.

QUEVEDO, J. et al. Differential effects of emotional arousal in short- and long-term memory in healthy adults. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 79, n. 2, p. 132–135, mar. 2003.

QUEVEDO, J. et al. Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. **Behav Brain Res**, v. 154, p. 339–43, out. 2004.

QUIRK, G. J. et al. Erasing fear memories with extinction training. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 45, p. 14993–14997, 10 nov. 2010.

RADULOVIC, J.; REN, L. Y.; GAO, C. N-Methyl D-aspartate receptor subunit signaling in fear extinction. **Psychopharmacology**, 20 set. 2018.

RAMIREZ, M. J. et al. Serotonergic therapies for cognitive symptoms in Alzheimer's disease: rationale and current status. **Drugs**, v. 74, n. 7, p. 729–736, maio 2014.

RAO, J. S. et al. n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. **Molecular Psychiatry**, v. 12, n. 1, p. 36–46, jan. 2007.

RAPPORT, M. M.; GREEN, A. A.; PAGE, I. H. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 176, n. 3, p. 1243–1251, dez. 1948.

REBOUÇAS, R. C.; SCHMIDEK, W. R. Handling and isolation in three strains of rats affect open field, exploration, hoarding and predation. **Physiology & Behavior**, v. 62, n. 5, p. 1159–1164, nov. 1997.

REISS, W. G.; OLES, K. S. Acetazolamide in the treatment of seizures. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 30, n. 5, p. 514–519, maio 1996.

RENOULT, L. et al. Personal semantics: at the crossroads of semantic and episodic memory. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 16, n. 11, p. 550–558, nov. 2012.

RESCORLA, R. A. Are associative changes in acquisition and extinction negatively accelerated? **Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes**, v. 27, n. 4, p. 307–315, out. 2001.

ROBERTS, A. J. et al. Mice lacking 5-HT receptors show specific impairments in contextual learning. **The European journal of neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 1913–1922, abr. 2004a.

ROBERTS, A. J.; HEDLUND, P. B. The 5-HT(7) receptor in learning and memory. **Hippocampus**, v. 22, n. 4, p. 762–771, abr. 2012.

ROBERTS, C. et al. GABAergic modulation of 5-HT7 receptor-mediated effects on 5-HT efflux in the guinea-pig dorsal raphe nucleus. **Neuropharmacology**, v. 46, n. 7, p. 935–941, jun. 2004b.

RODRÍGUEZ, J. J.; NORISTANI, H. N.; VERKHRATSKY, A. The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease. **Progress in neurobiology**, v. 99, n. 1, p. 15–41, out. 2012.

ROSS, B. M. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and anxiety disorders. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 81, n. 5–6, p. 309–312, dez. 2009.

RUDY, J. W.; HUFF, N. C.; MATUS-AMAT, P. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 7, p. 675–685, nov. 2004.

RUSSELL, M. G. N.; DIAS, R. Memories are made of this (perhaps): a review of serotonin 5-HT(6) receptor ligands and their biological functions. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 6, p. 643–654, jun. 2002.

RYGULA, R. et al. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. **Behavioural Brain Research**, v. 162, n. 1, p. 127–134, 1 jul. 2005.

SALEM, N. et al. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. **Lipids**, v. 36, n. 9, p. 945–959, set. 2001.

SALVADOR, A.; COSTA, R. Coping with competition: neuroendocrine responses and cognitive variables. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 2, p. 160–170, fev. 2009.

SAMBETH, A. et al. Sex differences in the effect of acute tryptophan depletion on declarative episodic memory: a pooled analysis of nine studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 4, p. 516–529, 2007.

SANTINI, E.; MULLER, R. U.; QUIRK, G. J. Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 22, p. 9009–9017, 15 nov. 2001.

SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. **Archives of General Psychiatry**, v. 57, n. 10, p. 925–935, out. 2000.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, fev. 2000.

SARA, S. J. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 7, n. 2, p. 73–84, abr. 2000.

SARKISYAN, G.; HEDLUND, P. B. The 5-HT₇ receptor is involved in allocentric spatial memory information processing. **Behavioural brain research**, v. 202, n. 1, p. 26–31, 24 ago. 2009.

SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E. Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 18, p. RC96, 15 set. 2000.

SCHELLER-GILKEY, G. et al. Relationship of Clinical Symptoms and Substance Use in Schizophrenia Patients on Conventional Versus Atypical Antipsychotics. **The American Journal of Drug and Alcohol Abuse**, v. 29, n. 3, p. 553–566, jan. 2003.

SCHMIDT, S. D. et al. PACAP modulates the consolidation and extinction of the contextual fear conditioning through NMDA receptors. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 118, p. 120–124, fev. 2015.

SCHMIDT, S. D. et al. Modulation of the consolidation and reconsolidation of fear memory by three different serotonin receptors in hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 142, n. Pt A, p. 48–54, jul. 2017.

SCHMITT, U.; HIEMKE, C. Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 59, n. 4, p. 807–811, abr. 1998.

SCHUCHARD, J.; THOMPSON, C. K. Implicit and explicit learning in individuals with agrammatic aphasia. **Journal of Psycholinguistic Research**, v. 43, n. 3, p. 209–224, jun. 2014.

SCHWABE, L.; NADER, K.; PRUESSNER, J. C. Reconsolidation of human memory: brain mechanisms and clinical relevance. **Biological Psychiatry**, v. 76, n. 4, p. 274–280, 15 ago. 2014.

SCOZZAFAVA, A.; IORGA, B.; SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase activators: synthesis of high affinity isozymes I, II and IV activators, derivatives of 4-(4-tosylureido-amino acyl)ethyl-1H-imidazole (histamine derivatives). **Journal of Enzyme Inhibition**, v. 15, n. 2, p. 139–161, 2000.

SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase activators: high affinity isozymes I, II, and IV activators, incorporating a beta-alanyl-histidine scaffold. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 284–291, 17 jan. 2002a.

SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase activators: human isozyme II is strongly activated by oligopeptides incorporating the carboxyterminal sequence of the bicarbonate anion exchanger AE1. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 8, p. 1177–1180, 22 abr. 2002b.

SELYE, H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. **Nature**, v. 138, n. 3479, p. 32–32, jul. 1936.

SHAHAR-GOLD, H.; GUR, R.; WAGNER, S. Rapid and reversible impairments of short- and long-term social recognition memory are caused by acute isolation of adult rats via distinct mechanisms. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e65085, 2013.

SHARP, F. R. et al. NMDA and D1 receptors mediate induction of c-fos and junB genes in striatum following morphine administration: implications for studies of memory. **Behavioural Brain Research**, v. 66, n. 1–2, p. 225–230, 23 jan. 1995.

SHER, L.; VILENS, A. **Neurobiology of post-traumatic stress disorder**. New York: Nova Biomedical, 2010.

SHIMIZU, E. et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 70–75, 1 jul. 2003.

SHIRAZI, S. N. et al. Glucocorticoids and the Brain: Neural Mechanisms Regulating the Stress Response. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 872, p. 235–252, 2015.

SILVA, B. A.; GROSS, C. T.; GRÄFF, J. The neural circuits of innate fear: detection, integration, action, and memorization. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 23, n. 10, p. 544–555, 2016.

SINGEWALD, N. et al. Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 149, p. 150–190, maio 2015.

SIVIY, S. M.; PANKSEPP, J. In search of the neurobiological substrates for social playfulness in mammalian brains. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 9, p. 1821–1830, out. 2011.

SLATTERY, D. A.; MARKOU, A.; CRYAN, J. F. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. **Psychopharmacology**, v. 190, n. 4, p. 555–568, mar. 2007.

SORRELLS, S. F.; SAPOLSKY, R. M. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 3, p. 259–272, mar. 2007.

SOULÉ, J.; MESSAOUDI, E.; BRAMHAM, C. R. Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. Pt 4, p. 600–604, ago. 2006.

SPEAR, N. E. Retrieval of memory in animals. **Psychological Review**, v. 80, n. 3, p. 163–194, 1973.

SQUIRE, L. R. The organization and neural substrates of human memory. **International Journal of Neurology**, v. 21–22, p. 218–222, 1988 1987.

SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

SQUIRE, L. R.; KNOWLTON, B.; MUSEN, G. The structure and organization of memory. **Annual Review of Psychology**, v. 44, p. 453–495, 1993.

SQUIRE, L. R.; WIXTED, J. T.; CLARK, R. E. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 11, p. 872–883, nov. 2007.

STALEY, K. J.; SOLDÓ, B. L.; PROCTOR, W. R. Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABAA receptors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 269, n. 5226, p. 977–981, 18 ago. 1995.

STERN, S. A.; ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory enhancement. **Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 37–53, fev. 2013.

STIEDL, O. et al. The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT_{1A} and 5-HT₇ and its interaction in emotional learning and memory. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 162, 2015.

STONEY, P. N.; MCCAFFERY, P. A Vitamin on the Mind: New Discoveries on Control of the Brain by Vitamin A. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 115, p. 98–108, 2016.

STREKALOVA, T. et al. Memory retrieval after contextual fear conditioning induces c-Fos and JunB expression in CA1 hippocampus. **Genes, Brain, and Behavior**, v. 2, n. 1, p. 3–10, fev. 2003.

SU, H.-M. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 5, p. 364–373, maio 2010.

SUN, M. K.; ALKON, D. L. Pharmacological enhancement of synaptic efficacy, spatial learning, and memory through carbonic anhydrase activation in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 3, p. 961–967, jun. 2001.

SUN, M.-K.; ALKON, D. L. Carbonic anhydrase gating of attention: memory therapy and enhancement. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 83–89, fev. 2002.

SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 7, n. 2, p. 168–181, fev. 2008.

SUPURAN, C. T. Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 759–772, dez. 2012.

SUPURAN, C. T. Drug interaction considerations in the therapeutic use of carbonic anhydrase inhibitors. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 12, n. 4, p. 423–431, 2016a.

SUPURAN, C. T. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 345–360, 2016b.

SUPURAN, C. T. Advances in structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 1, p. 61–88, 2 jan. 2017.

SUPURAN, C. T.; SCOZZAFAVA, A.; CASINI, A. Carbonic anhydrase inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 23, n. 2, p. 146–189, mar. 2003.

SUPURAN, C. T.; SCOZZAFAVA, A.; CONWAY, J. (EDS.). **Carbonic anhydrase: its inhibitors and activators**. Boca Raton: CRC Press, 2004.

SZABO, S. et al. “Stress” is 80 Years Old: From Hans Selye Original Paper in 1936 to Recent Advances in GI Ulceration. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 27, p. 4029–4041, 2017.

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

TAMASHIRO, K. L. K.; NGUYEN, M. M. N.; SAKAI, R. R. Social stress: from rodents to primates. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 26, n. 1, p. 27–40, abr. 2005.

TAUBENFELD, S. M. et al. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. **Nature Neuroscience**, v. 4, n. 8, p. 813–818, ago. 2001.

TEMPERINI, C.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase activation and the drug design. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 7, p. 708–715, 2008.

THOMAS, D. R. 5-HT_{2A} receptors as a therapeutic target. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 3, p. 707–714, set. 2006.

TONEGAWA, S.; MORRISSEY, M. D.; KITAMURA, T. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 485–498, ago. 2018.

TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 317–331, jun. 2015.

TREZZA, V.; BAARENDSE, P. J. J.; VANDERSCHUREN, L. J. M. J. The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 10, p. 463–469, out. 2010.

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

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 53, n. 4, p. 865–871, out. 2002.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; ACHTERBERG, E. J. M.; TREZZA, V. The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 70, p. 86–105, nov. 2016.

VANELZAKKER, M. B. et al. From Pavlov to PTSD: the extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 113, p. 3–18, set. 2014.

VIANNA, M. R. et al. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 12251–12254, 9 out. 2001.

VOLK, B. et al. Medicinal chemistry of 5-HT_{5A} receptor ligands: a receptor subtype with unique therapeutical potential. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 5, p. 554–578, 2010.

WAITZBERG, D. L.; GARLA, P. [Contribution of omega-3 fatty acids for memory and cognitive function]. **Nutricion Hospitalaria**, v. 30, n. 3, p. 467–477, 1 set. 2014.

WATSON, R. R.; MEESTER, F. D. **Omega-3 fatty acids in brain and neurological health**. [s.l.: s.n.].

WESOŁOWSKA, A. In the search for selective ligands of 5-HT₅, 5-HT₆ and 5-HT₇ serotonin receptors. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 327–341, ago. 2002.

WILLNER, P. et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, n. 3, p. 358–364, 1987.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v. 134, n. 4, p. 319–329, dez. 1997.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90–110, 2005.

WOOD, K. H.; VER HOEF, L. W.; KNIGHT, D. C. Neural mechanisms underlying the conditioned diminution of the unconditioned fear response. **NeuroImage**, v. 60, n. 1, p. 787–799, mar. 2012.

WRIGHT, R.; RAIMONDO, J. V.; AKERMAN, C. J. Spatial and temporal dynamics in the ionic driving force for GABA(A) receptors. **Neural Plasticity**, v. 2011, p. 728395, 2011.

WU, A.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, n. 10, p. 1457–1467, out. 2004.

XU, W. J. et al. Involvement of ventrolateral orbital cortex 5-HT 1-7 receptors in 5-HT induced depression of spared nerve injury allodynia. **Neuroscience**, v. 238, p. 252–257, 15 maio 2013.

YANG, M.-T. et al. Acetazolamide impairs fear memory consolidation in rodents. **Neuropharmacology**, v. 67, p. 412–418, abr. 2013.

YEHUDA, S. et al. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. **Neurobiology of Aging**, v. 23, n. 5, p. 843–853, out. 2002.

YILDIRIM, M. et al. Postpubertal decrease in hippocampal dendritic spines of female rats. **Experimental Neurology**, v. 210, n. 2, p. 339–348, abr. 2008.

YOSHII, A.; CONSTANTINE-PATON, M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. **Developmental Neurobiology**, v. 70, n. 5, p. 304–322, abr. 2010.

YOUUDIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 18, n. 4–5, p. 383–399, ago. 2000.

YUN, H.-M.; RHIM, H. The serotonin-6 receptor as a novel therapeutic target. **Experimental neurobiology**, v. 20, n. 4, p. 159–168, dez. 2011.

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, maio 2011.